

UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

École doctorale complexité du vivant

Institut Pasteur, Unité Génétique du Développement de la Drosophile

Division asymétrique et remodelage de la polarité épithéliale :

Dynamique de la polarisation des cellules précurseurs des
organes sensoriels externes chez *Drosophila melanogaster*.

Par : Charlotte BESSON

Thèse de doctorat en Biologie Cellulaire

Dirigée par François Schweisguth

Soutenue le 22 Septembre 2014

Devant un jury composé de :

Mme Agnès Audibert	Professeur de l'Université Paris 6	Présidente
Mr Roland Le Borgne	DR1 CNRS	Rapporteur
Mr Franck Pichaud	Group Leader UCL	Rapporteur
Mr André Le Bivic	DR1 CNRS	Examineur
Mr François Schweisguth	DR1 CNRS	Directeur de thèse



Except where otherwise noted, this work is licensed under
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

"Le seul véritable voyage, ce ne serait pas d'aller vers de nouveaux paysages, mais d'avoir d'autres yeux."

Marcel Proust.

À mes parents.

Remerciements

Merci à François qui, il y a cinq ans, m'a accordé sa confiance, et proposé de travailler sur l'un de ses "bébés" : la division asymétrique de la SOP. Au jour le jour, j'ai énormément appris de ta rigueur, et pleinement profité de l'encyclopédie scientifique que tu représentes. J'espère avoir retenu ne serait-ce qu'un cinquième de ce que tu es capable de transmettre. Au labo, il y a des moments où, pour nous citer tous, "en fait, on ne comprend rien", ni nos résultats, ni notre Recherche. C'est au cours de ces moments que tes discussions étaient les plus stimulantes, parfois cinq minutes suffisaient à me redonner un cap. Au-delà de l'encadrement de mon projet de Thèse, tu as aussi su t'adapter à mes défauts, et accepter mes choix, tout en continuant de m'encourager. Bref c'est grâce à ton accompagnement et ton enthousiasme constants que je présente aujourd'hui, avec une grande fierté, ce travail.

Merci à Agnès Audibert, Roland Le Borgne, Franck Pichaud et André Le Bivic d'avoir si promptement accepté d'évaluer ce travail, merci pour votre temps et votre réflexion. Si le travail de Thèse confronte les étudiants à la Recherche, il représente pour la plupart d'entre eux un deuxième challenge, celui de l'enseignement. C'est pourquoi je remercie tout particulièrement Agnès, qui a su me soutenir et me redonner confiance, et grâce à qui enseigner, même avec un soupçon d'anxiété, est devenu un plaisir.

Merci à tout ceux qui, en me donnant accès à leur paillasse, ont pris en charge ma formation. Merci à Solenn Stoeckel, de m'avoir fait découvrir la programmation, une grande partie de ce travail de Thèse vient de ce que j'ai appris avec toi. Merci à Michel Gho, qui m'a fait découvrir le monde merveilleux de la *Drosophila*. Merci d'avoir toujours pris le temps de m'écouter et de me conseiller, dans ton labo et au cours des années qui ont suivi. Merci à Jennifer Bandura de m'avoir concocté un stage sur mesure, et de m'avoir fourni le "kit de survie" du thésard en m'apprenant toutes les techniques classiques de la génétique de la *Drosophila* et de la biologie moléculaire.

Je tiens aussi à remercier tout le corps enseignant des universités Paris 6 et Paris 7, pour leur dévouement et pour la qualité des enseignements proposés. Grâce à vous, je garderai toujours un excellent souvenir de mes "années Jussieu". Enfin, un grand merci

à Bertrand Rouaix, mon professeur de Biologie du secondaire, qui m'a donné l'envie d'apprendre et de comprendre, et dont la rigueur m'a permis de passer avec aisance mes années à l'université.

Fred, merci d'avoir accepté de travailler avec moi sans jamais sourciller, et d'avoir toujours été extrêmement conciliant. Je resterai toujours admirative devant ton organisation légendaire et ta capacité de travail extraordinaire. Toujours preneur et fournisseur de (plus ou moins) bon jeux de mots, je me suis aussi bien amusée en te côtoyant ! Hervé, merci pour ton intervention clé dans ce projet, il y a clairement eu un avant et un après "vecteurs de polarité" dans ma thèse. Je garderai aussi longtemps en mémoire ton désormais célèbre "*mais, c'est trivial!*", ainsi que nos *fraking* conversations sans fin sur Battlestar. Enfin, merci à Francis d'avoir consacré autant de ton temps à un projet qui s'achevait, j'espère que nous ne t'avons pas trop ennuyé avec nos multiples réclamations !

Merci à tous mes co-étudiants du labo ! Soline, ça a été *fichtrement* cool de travailler à tes cotés *j'te l'dit ma vieille* ! Sais-tu que même après ton départ, ta façon atypique de prononcer les noms de gènes me hante toujours : *bazooka-bazooka-bazooka* ou encore *Canoooooe* ! Je garde aussi un souvenir ému de toutes nos conversations existentielles entre deux changements d'anticorps, ou encore au Bréguet, entre deux bières. Gantas et le désormais indissociable Mateusz, que dire, ça a été vraiment sympa de partager ce bureau avec vous, toujours le mot pour rire, toujours l'envie de faire la fête, mais en même temps toujours l'envie de faire de la science, de comprendre, et d'avancer. Quelque fois source de distractions, vous m'avez aussi souvent redonné l'envie de bosser, merci à vous ! J'ai aussi une pensée pour les désormais post-doc Sara, Oriane et Carolina, ainsi que pour les étudiantes croisées au labo, Léa et Marie.

Merci aussi aux "grands" du labo. Lydie, tu as le don de rechercher, et de trouver, ce qui est bon chez tout le monde, et c'est pourquoi il est extrêmement reposant de passer du temps avec toi. Merci d'avoir toujours pris le temps de discuter ! Merci aussi à Franck, toujours prêt à rendre service, tu sais aussi écouter, conseiller et inviter au Bréguet quand il le faut. Bref, tu es quelqu'un sur qui on peut compter. Khalil, je garderai toujours en mémoire tes réactions à chaud sur tous les sujets d'actualité, ainsi que tes cours de diététique à table. Vanessa, quasiment dernière arrivée tu es vite devenue le rire du labo et les mercredi sans toi sont bien calmes.

Stéphanie, ça a été un réel plaisir de te côtoyer, toujours en quête de conversation et de challenge, tu as le chic pour poser les bonnes questions au bon moment, et aucun sujet ne t'arrête. C'est un mode de fonctionnement très éloigné du mien, et par conséquent tu m'as beaucoup appris. Merci à toi.

Merci aussi aux autres membres du labo passés et présents, Allison, David, Véro, Isabelle, Laurence, Alyona et Maria, bonne continuation à vous.

Merci aux filles de la Danse, Patou, Mel, Sophie et toutes les autres, sans le savoir vous m'avez donné l'équilibre nécessaire pour avancer sans tomber, au sens propre comme au sens figuré !

Merci à Thibaut, non seulement pour les heures que tu as passées à corriger mes innombrables fautes d'orthographe, mais aussi pour ta présence au cours de ces mois de rédaction, avec une mention spéciale pour la fameuse soirée vin-fromage-charcut', décidément le meilleur remède existant contre le stress. Penser à le prescrire plus souvent.

À ma famille, mes parents, mes grands-parents, Sébastien et Caroline, simplement, merci ...

Table des matières

I	Introduction	1
	Introduction générale	3
	La division asymétrique	3
	La polarité cellulaire et les protéines PAR	5
1	Régulation du complexe PAR dans les divisions asymétriques	9
1.1	Les divisions asymétriques du zygote de <i>C.elegans</i> et des neuroblastes de <i>D.melanogaster</i>	9
1.2	Apparition de l'asymétrie	10
1.2.1	Le zygote du <i>C.elegans</i>	10
1.2.2	Les neuroblastes de l'embryon de <i>D.melanogaster</i>	12
1.3	Recrutement au cortex des composants du complexe PAR	13
1.3.1	Localisation de Baz	13
1.3.2	Localisation de Par-6 et aPKC	15
1.4	Interactions entre le complexe PAR et les autres protéines de polarité . . .	17
1.4.1	PAR-2, PAR-5 et Par1	17
1.4.2	Lgl	17
1.5	Complexe PAR: réalité ou simplification?	19
1.5.1	Colocalisation des protéines du complexe PAR	20
1.5.2	Activité du complexe PAR	20
1.6	Conclusion sur le complexe PAR dans les divisions asymétriques	21
2	La polarité épithéliale	23
2.1	Le domaine jonctionnel	24
2.1.1	Description des jonctions adhérentes	24
2.1.2	Régulation de l'endocytose de E-Cad	25
2.1.3	Régulation de la ceinture d'actine par les petites GTPases	27
2.2	Les PAR s'associent à d'autres protéines de polarité	27
2.2.1	Le domaine apical	27
2.2.2	Le domaine baso-latéral	29

2.3	Les protéines PAR dans la polarité apico-basale	29
2.3.1	Localisation au cortex des composantes du complexe PAR dans les cellules épithéliales	30
2.3.2	Le domaine apical et la séparation des protéines du complexe PAR	31
2.3.3	Le domaine basolatéral et l'exclusion des protéines Par	34
2.4	Régulation et fonctions de Crumbs	35
2.4.1	Régulation de Crumbs dans les cellules épithéliales	36
2.4.2	Crumbs et ses multiples fonctions	38
2.5	Polarité planaire	41
2.5.1	La voie PCP (<i>Planar Cell Polarity</i>)	41
2.5.2	Un autre type de polarité planaire: l'extension de la bande germinale	43
2.6	Conclusions sur la polarité épithéliale	48
3	La division asymétrique de la SOP.	49
3.1	Le lignage de la SOP.	49
3.2	Description générale de la division asymétrique.	53
3.3	Etablissement de l'axe de polarité.	54
3.3.1	Rôle de la PCP.	54
3.3.2	Influence réciproque des domaines antérieurs et postérieurs.	54
3.3.3	Redondance de la voie PCP et des complexes antérieur et postérieur.	57
3.4	Ségrégation asymétrique des déterminants cellulaires : la protéine Lgl. . . .	57
3.5	Orientation du fuseau mitotique.	59
3.6	Les indices d'une polarisation précoce du complexe PAR.	61
II	Résultats	63
1	Objectifs	65
1.1	Porter un nouveau regard sur la SOP	65
1.2	Avec quels outils ?	66
2	Résumé des résultats	69
2.1	Développement d'une méthode de mesure quantitative de l'asymétrie	69
2.2	Baz, Par-6 et aPKC sont polarisées avant l'entrée en mitose	70
2.3	La PCP est responsable de la disparition de la symétrie.	71
2.4	Un remodelage de la polarité épithéliale spécifique des SOP entraine leur polarisation.	71
2.4.1	L'inhibition de <i>p120ctn</i> induit le remodelage des jonctions de la SOP, induisant la polarisation	72

2.4.2	L'inhibition d' <i>expanded</i> promeut l'internalisation de Crumbs, induisant la polarisation	72
2.5	Modèle	73
3	Article : Symmetry breaking by Planar Cell Polarity, Crumbs down-regulation and junction remodeling direct asymmetric cell division in a <i>Drosophila</i> epithelium	75
	Abstract	77
	Introduction	78
	Results	80
	A quantitative live imaging assay for planar polarization	80
	Baz, Par6 and aPKC are planar polarized prior to mitosis	81
	Symmetry breaking by Planar Cell Polarity	84
	Crumbs inhibits the polarization of Par6 and Baz	85
	Expression profiling of SOPs	88
	A p120ctn-regulated remodeling of AJs in SOPs	90
	Ex regulates Crb endocytosis and Par6 planar polarization	92
	Discussion	95
	Methods	98
	Acknowledgements	105
	References	106
	Supplementary Data	111
4	Résultats supplémentaires	125
4.1	L'inhibition de <i>neuralized</i> favorise l'asymétrie de Par-6	125
4.2	Le contour des SOP présente une forte intensité de GFP-Baz, Par-6-GFP et aPKC-GFP	126
4.3	L'inhibition de la PCP affecte l'intensité moyenne de GFP-Baz, mais pas celle de Par6-GFP	127
4.4	Les SOP sont capable de se diviser de manière asymétrique à 12h30APF .	128
III	Discussion	131
1	Conclusion	133
2	Perspectives	135
2.1	Quand la SOP acquière-t-elle le potentiel de se diviser asymétriquement? .	135
2.2	Mieux comprendre la dynamique de la polarisation.	136

2.3	La formation du complexe PAR, et son rôle dans la mise en place de l'asymétrie	138
2.3.1	Polarité épithéliale du notum et formation du complexe PAR	138
2.3.2	Le trafic de Crumbs et de E-Cad par le Retromer favorise la formation du complexe PAR?	139
2.3.3	Analyse de la mobilité de Bazooka aux jonctions	140
2.4	Comment le complexe PAR interprète-t-il la PCP ?	142
2.5	L'entrée en mitose et la colonisation du domaine latéral.	143
2.5.1	La colonisation du domaine latéral	143
2.5.2	Les protéines du domaine basal	144
	Conclusion générale	144
 Annexes		148
 Annexe A Calcul des vecteurs de polarisation		149
 Annexe B Etude des intensités moyennes et de la forme des cellules		159
 Annexe C Analyse des données FRAP		161
 Bibliographie		166
 Résumé & abstract		181

Table des figures

Figure 1	Divisions asymétriques extrinsèques et intrinsèques	4
Figure 2	Localisation des protéines PAR dans les cellules polarisées	7
Figure 3	Interactions entre les protéines du complexe PAR	10
Figure 4	Division asymétrique du zygote du <i>C.elegans</i>	11
Figure 5	Les Rho GTPases	12
Figure 6	Division asymétrique des neuroblastes de <i>D.melanogaster</i>	13
Figure 7	Localisation asymétrique de Baz dans les divisions asymétrique . . .	14
Figure 8	Cdc42 dans la division asymétrique	16
Figure 9	La phosphorylation de Lgl dans les divisions asymétriques	18
Figure 10	Localisations de Par-6-aPKC et de Baz	21
Figure 11	Complexes apicaux et baso-latéraux	23
Figure 12	Organisation des jonctions chez la Drosophile et les Mammifères . .	24
Figure 13	Organisation des jonctions adhérentes	26
Figure 14	Les multiples complexes apicaux	28
Figure 15	Localisation de Baz aux jonctions dans l'épithélium embryonnaire . .	30
Figure 16	Exclusion de Baz du domaine apical	33
Figure 17	Exclusion de Baz du domaine basolatéral par Par-1	35
Figure 18	Trafic intracellulaire de Crumbs	37
Figure 19	La protéine Crumbs et ses interacteurs	39
Figure 20	Les protéines de la PCP	42
Figure 21	Polarité planaire pendant l'extension de la bande germinale	44
Figure 22	Etude par FRAP de la mobilité de Cadherine aux jonctions	47
Figure 23	Le lignage de la SOP	50
Figure 24	La voie de signalisation Notch	51
Figure 25	Inhibition latérale	52
Figure 26	Division asymétrique de la SOP	53
Figure 27	Fz-GFP est enrichie au pôle apical postérieur des SOPs en prophase	55
Figure 28	Vang est enrichie au pôle apical antérieur des SOPs en prophase . .	55
Figure 29	L'absence de Gai inhibe l'asymétrie complexe PAR	56
Figure 30	Lgl et la formation du complexe PAR	58

Figure 31	Orientation du fuseau mitotique par le complexe Pins-Gai-Mud . . .	59
Figure 32	Orientation du fuseau mitotique par Pins-Gai et Dsh-Fz	60
Figure 33	Polarisation précoce de Baz: Fz et Dlg	62
Figure 34	Polarisation précoce de Baz: Aurora-A	62
Figure 35	Modèle: Mise en place de l'asymétrie dans la SOP	74
Figure 36	L'inhibition de <i>neuralized</i> favorise l'asymétrie de Par-6	126
Figure 37	Le contour des SOP présente une forte intensité de GFP-Baz, Par-6-GFP et aPKC-GFP	127
Figure 38	L'inhibition de la PCP affecte l'intensité moyenne de GFP-Baz, mais pas celle de Par6-GFP	128
Figure 39	Les SOP sont capable de se diviser de manière asymétrique à 12h30APF	129
Figure 40	Etudes des fraction mobiles et immobiles	141
Figure 41	Les contours des cellules sont relevés grâce au plugin FIJI "JFilament"	150
Figure 42	Calcul du vecteur de polarité: les différentes étapes.	151
Figure 43	Direction du vecteur de polarité.	154
Figure 44	Mesure de l'orientation de la polarisation par rapport à l'axe antéro-postérieur.	155
Figure 45	Analyse des intensités moyennes	159
Figure 46	Mesure de la solidité	160
Figure 47	Zones analysées pendant l'expérience de FRAP.	161

Figures de l'article

Figure 1	A quantitative analysis of planar polarization	80
Figure 2	Concomitant onset of the planar polarization of Baz, Par6 and aPKC at interphase.	83
Figure 3	PCP is required for the asymmetric planar distribution of Baz and Par6 in SOPs	85
Figure 4	Crb antagonizes the planar polarization of Baz and Par6 in SOPs	86
Figure 5	RNA profiling of SOPs	89
Figure 6	p120ctn-regulated AJ remodeling	90
Figure 7	Expanded prevents Crumbs internalisation, hence polarisation	94

Figures supplémentaires de l'article

Figure S1	localization of GFP-tagged proteins in dividing SOPs	111
Figure S2	building a polarity vector	112
Figure S3	cross-regulatory interactions between Baz, Par6 and aPKC	113
Figure S4	Planar polarization of Par6 and Baz in various silencing contexts	114
Figure S5	GFP-Baz localization at mitosis in <i>fmi^{RNAi}</i> and <i>Vang^{RNAi}</i> SOPs	115
Figure S6	Role of Hippo signaling in the planar polarization of Par6	116

Première partie

Introduction

Introduction générale

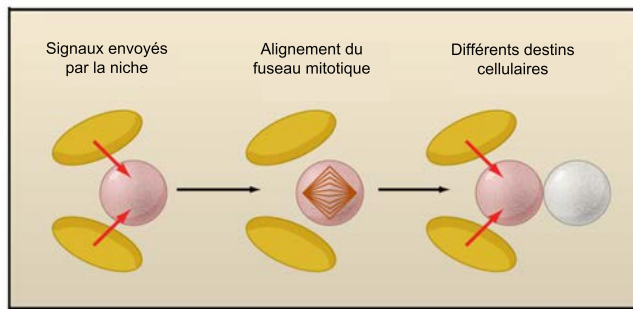
La cellule peut être décrite de manière simple, unité fondamentale du vivant, c'est la brique à partir de laquelle les êtres vivants se construisent. Et pourtant, dans un même organisme, il peut exister une diversité de types cellulaires si grande que nous ne pouvons en entrevoir le nombre. Cette diversité est d'autant plus renversante que toutes les cellules d'un même organisme sont issues d'une cellule unique, la cellule oeuf. Quand l'étude de l'Évolution veut appréhender le phénomène de spéciation, l'enjeu de la Biologie du Développement est de déchiffrer les mécanismes aboutissant à de telles diversités de types cellulaires, de tissus, d'organes et de fonctions, dans un même individu.

La division asymétrique

Divers mécanismes régissent l'apparition de la diversité cellulaire, allant du simple emplacement géographique de la cellule dans l'embryon, à l'intégration des différents signaux moléculaires envoyés par les cellules voisines. L'un de ces mécanismes est la division asymétrique. Sous le terme de "division asymétrique" est regroupé toute division donnant deux cellules filles différentes. Différentes en taille, ou affichant différents destins cellulaires. La définition classique de la cellule souche évoque sa capacité à accomplir ce type de division : l'une de ses cellules filles conserve son caractère indifférencié pendant que la seconde se différencie.

Deux grands types de divisions asymétriques peuvent être décrits : extrinsèques et intrinsèques [Horvitz and Herskowitz, 1992]. Lors des divisions asymétriques dites extrinsèques, l'environnement décide du destin cellulaire des cellules filles. La division des cellules souches associées à une niche en est l'exemple typique : Lors de leur division asymétrique, l'une des cellules filles est spatialement éloignée de la niche et ne reçoit pas les signaux émis par cette dernière. En revanche, l'autre cellule fille reste en contact étroit avec la niche et continue de recevoir ces signaux. Cette simple différence est à l'origine de l'acquisition de destins cellulaires différents entre les deux cellules filles (Fig 1A).

A. Division asymétrique extrinsèque



B. Division asymétrique intrinsèque

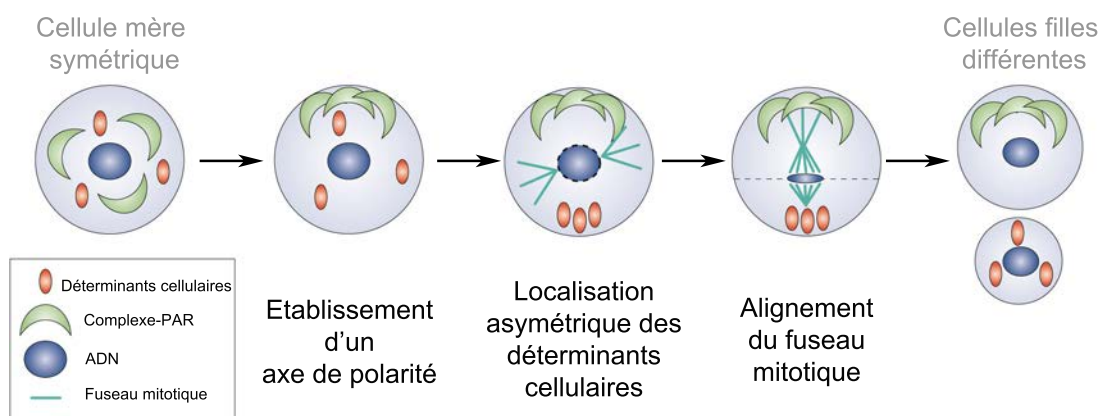


FIGURE 1 – Divisions asymétriques extrinsèques et intrinsèques, adapté de [Knoblich, 2008] et [Gönczy, 2008]

A. Division asymétrique extrinsèque : La niche envoie des signaux à la cellule souche. L'orientation du fuseau mitotique perpendiculairement à la niche éloigne une des deux cellules filles de la niche. Ainsi l'une des filles continue de recevoir des signaux de la niche et conserve son caractère de cellule souche, alors que la seconde se différencie.

B. Division asymétrique intrinsèque : Dans une cellule jusqu'alors non polarisée, un axe de polarité apparaît, visible par la localisation asymétrique du complexe-PAR. S'ensuit la distribution polarisée des déterminants cellulaires au pôle opposé de la cellule. Enfin le fuseau mitotique s'aligne le long de l'axe de polarité, permettant la ségrégation des déterminants cellulaires dans une des deux cellules filles.

La division asymétrique intrinsèque repose sur la mise en place d'une polarité au sein de la cellule mère. La localisation asymétrique à un pôle de la cellule de "déterminants cellulaires", et par conséquent, leur ségrégation dans une seule des cellules filles conduit à l'acquisition de destins cellulaires différents. Classiquement, trois étapes majeures peuvent être distinguées : l'établissement d'un axe de polarité, la distribution polarisée de facteurs régulateurs de l'identité des cellules filles (ou déterminants cellulaires), et l'alignement du fuseau mitotique le long de l'axe de polarité, assurant la distribution des déterminants cellulaires dans seulement une des deux cellules filles (Fig 1B).

Si de nombreuses études furent dédiées aux mécanismes régulant ces différentes phases, l'étape d'initiation, ou la mise en place de l'axe de polarité, reste aujourd'hui la plus énigmatique : Comment passe-t-on d'une cellule non-polarisée à une cellule polarisée ? Comment brise-t-on la symétrie ? L'établissement de l'axe de polarité dans la cellule mère se traduit par la localisation asymétrique à un pôle de la cellule du "complexe PAR", composé des protéines : Bazooka (Baz, ou Par3 chez les mammifères), Par-6 et aPKC (atypical Protein Kinase C) (Fig 1B). Mais les mécanismes sous-tendant l'asymétrie de ce complexe sont en grande partie inconnus. C'est pourquoi l'objectif principal de ma thèse est de comprendre les mécanismes menant à une telle asymétrie.

La polarité cellulaire et les protéines PAR

Pour comprendre la mise en place de l'asymétrie dans les divisions asymétriques intrinsèques, il nous faut d'abord appréhender la régulation de la polarité cellulaire en général. Dans de nombreuses situations, la fonction d'une cellule est associée à une polarisation, c'est à dire la mise en place d'une asymétrie au sein de la cellule. Ainsi, les neurones reçoivent des informations par les dendrites et envoient des signaux via l'axone, et ce fonctionnement polarisé se traduit par une organisation asymétrique caractéristique de ce type cellulaire. De la même façon, un épithélium est constitué de cellules étroitement liées les unes aux autres, formant une frontière entre deux milieux. Ce rôle de barrière sous-entend une polarisation des cellules, qui côtoient à un pôle le milieu extérieur (d'un organisme, d'un organe...) et à l'autre le milieu intérieur.

Baz, Par-6 et aPKC, formant le complexe PAR évoqué plus haut, sont associées au groupe des protéines PAR (PARtitioning-defectives). Les interactions entre les membres de ce groupe forment un réseau à la base des polarités cellulaires. Initialement découverts chez le nématode *C.elegans* pour leur rôle dans la division asymétrique du zygote [Kemphues et al., 1988], les gènes codants ces protéines sont conservés des nématodes aux mammifères (à l'exception de *par2*, présent uniquement chez le nématode), et régulent la quasi-totalité des types de polarité cellulaire décrits. Six protéines PAR peuvent être distinguées, de PAR-1 à PAR-6, et plusieurs interacteurs directs ont ensuite été identifiés, comme LGL-1 (Lethal Giant Larva 1) ou PKC-3 (Protein Kinase C 3) (table 1).

De nombreuses études chez *C.elegans* et *D.melanogaster* ont permis de décrypter les interactions génétiques et protéiques entre les protéines PAR. Beaucoup d'entre elles sont axées sur les divisions asymétriques intrinsèques du zygote de *C.elegans* et des neuroblastes de *D.melanogaster*, ainsi que sur la polarité apico-basale des épithéliums de *D.melanogaster*.

<i>C.elegans</i>	<i>D.melanogaster</i>	Protéine
<i>par-1</i>	<i>par-1</i>	Sérine-Thréonine kinase
<i>par-2</i>	?	Proteine RING
<i>par-3</i>	<i>bazooka (baz)</i>	Domaines multi-PDZ
<i>par-4</i>	<i>lkb1</i>	Sérine-Thréonine kinase
<i>par-5</i>	<i>14-3-3ϵ</i> et <i>14-3-3ζ</i>	Protéine 14-3-3
<i>par-6</i>	<i>par-6</i>	Domaines PDZ et semi-CRIB
<i>pkc-3</i>	<i>aPKC</i>	Sérine-Thréonine kinase
<i>lgl-1</i>	<i>Lgl</i>	Répétitions WD40

TABLE 1 – Nomenclature des protéines PAR et de leurs associées, adapté de [Nance and Zallen, 2011]

aPKC : Atypical Protein Kinase C, CRIB : Cdc42/Rac Interactive Binding, lgl : Lethal Giant Larva, PDZ : domaine commun à PSD95, DlgA, ZO-1, RING : Really Interesting New Gene, WD40 : Répétitions d'un motif d'une 40^{aine} d'acides aminés, pouvant s'assembler, protéine 14-3-3 : famille de protéines de liaison à des sites contenant des Sérines phosphorylées.

Dans les deux modèles de divisions asymétriques, le cortex est organisé en deux domaines complémentaires. L'un de ces domaines est occupé par le complexe PAR, et le cortex opposé est organisé par d'autres protéines, notamment PAR-1 (Figure 2 A et B).

Chez *D.melanogaster*, deux tissus sont classiquement utilisés pour l'étude de la polarité épithéliale, l'ectoderme embryonnaire et l'épithélium folliculaire ovarien (appelé épithélium folliculaire dans le reste du texte). Contrairement aux deux modèles de divisions asymétriques, les cellules épithéliales voient leur cortex subdivisé en trois domaines. En effet, pour former une couche de cellules étroitement connectées, les cellules épithéliales établissent des jonctions adhérentes. Ces jonctions forment une ceinture d'adhésion, et la concentration de protéines d'adhésion telles que les Cadhérines, mais aussi le recrutement d'un réseau d'actine et de myosine au niveau de ces jonctions, font de la ceinture d'adhésion un domaine cortical à part entière. La polarité apico-basale des cellules épithéliales est donc organisée en trois domaines : un domaine apical, un domaine jonctionnel, et un domaine baso-latéral. Les protéines PAR sont également organisées en trois domaines et les composantes du complexe PAR sont séparées. Par-6 et aPKC sont localisées au pôle apical et Bazooka est recrutée au jonctions. (Figure 2 C) [Harris and Peifer, 2005], [Morais-de Sá et al., 2010] et [Walther and Pichaud, 2010].

Ainsi, si l'initiation des divisions asymétriques intrinsèques requiert l'assemblage et la localisation polarisée du complexe PAR, les membres de ce complexe sont des régulateurs de la polarité cellulaire en général, et tous les types de polarité ne nécessitent pas la formation du complexe.

Ce travail de Thèse s'intéresse à la mise en place de la polarité dans la division asymétrique intrinsèque des cellules précurseurs des organes sensoriels de *D.melanogaster*

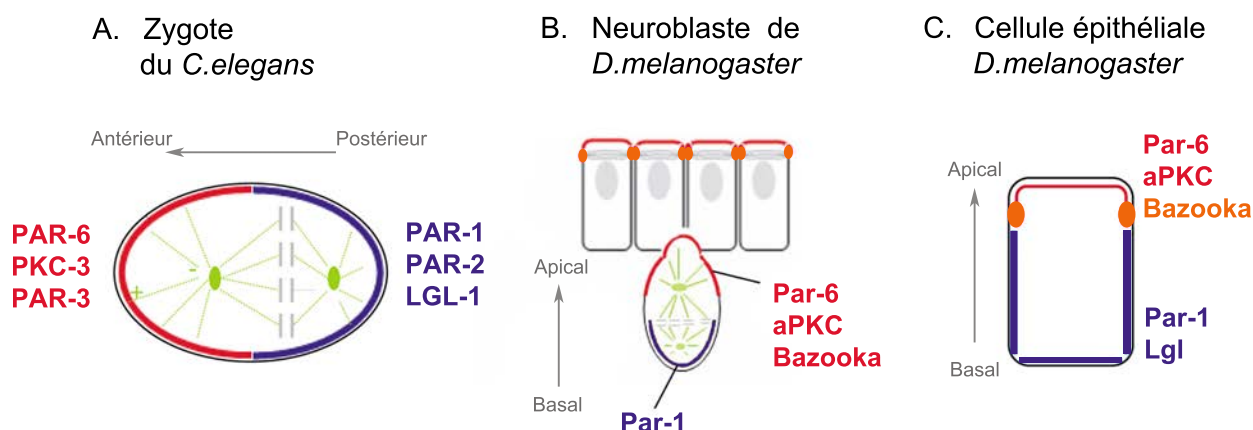


FIGURE 2 – Localisation des protéines PAR dans les cellules polarisées, adapté de [Suzuki and Ohno, 2006]

A. Division asymétrique intrinsèque du zygote du *C.elegans*. Le cortex est organisé en deux domaines, le long de l'axe antéro-postérieur. Le complexe PAR (PAR-3, PAR-6 et PKC-3 sont localisés au pôle antérieur, PAR-1, PAR-2 et LGL-1 sont au pôle postérieur.

B. Division asymétrique intrinsèque du neuroblaste de *D.melanogaster*. Les cellules délimitent d'un épithélium. Leur cortex est organisé en deux domaines, le long de l'axe apico-basal. Le complexe PAR est au pôle apical, Par-1 est au pôle basal.

C. Polarité épithéliale chez *D.melanogaster*. Le cortex est organisé en trois domaines le long de l'axe apico-basal. Par-6 et aPKC sont au pôle apical, Bazooka se localise au niveau des jonctions, enfin Par-1 et Lgl sont au domaine baso-latéral.

(SOP pour *Sensory Organ Precursor*). Je me suis ainsi focalisée sur les mécanismes menant à la localisation asymétrique du complexe PAR au pôle postérieur de la cellule. La SOP étant une cellule de l'épithélium dorsal du thorax (ou notum), elle possède la polarité apico-basale classique des épithéliums. L'enjeu de ce travail est de comprendre l'origine du remodelage de la polarité apico-basale des SOP, conduisant à la localisation au pôle postérieur du complexe PAR. Je me suis tout particulièrement intéressée à la régulation des trois protéines composant le complexe PAR, c'est à dire aux mécanismes menant à la formation du complexe et au contrôle de sa localisation asymétrique.

Dans cette introduction, je me concentre donc sur la régulation de Baz, Par-6 et aPKC chez la Drosophile, tout en m'appuyant sur les études menées chez le nématode *C.elegans*. Dans un premier temps, nous aborderons la mise en place de la polarité dans les divisions asymétriques intrinsèques du zygote du *C.elegans* et des neuroblastes de *D.melanogaster*, pour ensuite présenter le contrôle de la polarité épithéliale chez la Drosophile. Au cours de ces deux premières parties, nous nous focaliserons sur la localisation et l'activité des protéines du complexe PAR. Enfin, nous exposerons le cas particulier de la SOP, cellule épithéliale accomplissant une division asymétrique intrinsèque.

Chapitre 1

Régulation du complexe PAR dans les divisions asymétriques

Le zygote du *C.elegans* et les neuroblastes de *D.melanogaster* sont des modèles historiques de l'étude des divisions asymétriques et plus généralement de la polarité cellulaire. C'est d'ailleurs chez le *C.elegans* que furent identifiées les protéines PAR. Dans ce chapitre, après avoir exposé l'organisation générale de ces divisions, nous nous concentrerons sur les mécanismes associés à la localisation du complexe PAR, c'est à dire l'apparition de leur asymétrie, leur recrutement au cortex, et leurs interactions avec les autres protéines de polarité. Enfin, nous reviendrons sur la notion de "complexe PAR".

1.1 Les divisions asymétriques du zygote de *C.elegans* et des neuroblastes de *D.melanogaster*

Dans la division asymétrique du zygote de *C.elegans*, les protéines PAR peuvent être subdivisées en 3 catégories selon leur localisation. PAR-3, PAR-6 et PKC-3 sont localisées au cortex antérieur de la cellule, pendant que LGL-1, PAR-1 et PAR-2 sont au pôle postérieur, scindant le cortex du zygote en deux domaines distincts (Figure 2 A). PAR-4 et PAR-5 sont à la fois corticales et cytoplasmiques, mais réparties de manière uniforme dans le zygote (pour revue [Motegi and Seydoux, 2013]). Dans la division des neuroblastes de *D.melanogaster*, le complexe PAR se localise au pôle apical des cellules. Par-1 se situe au pôle basal et Lgl est répartie de manière uniforme autour du cortex (Figure 2 B et Figure 6 B) (pour revue [Prehoda, 2009]).

Dans ces deux exemples, Baz, Par-6 et aPKC se localisent à un pôle de la cellule. La notion de complexe-PAR est ainsi apparue. Soutenant cette idée de complexe, Baz, Par-6

et aPKC peuvent interagir physiquement. Par-6 et aPKC interagissent via leur domaines PB1, et le domaine PDZ1 de Baz interagit avec le domaine PDZ de Par-6 [Joberty et al., 2000]. aPKC est également capable de se lier à Baz, et de la phosphoryler, permettant une auto-régulation de la formation du complexe que nous détaillerons plus loin (Figure 3).

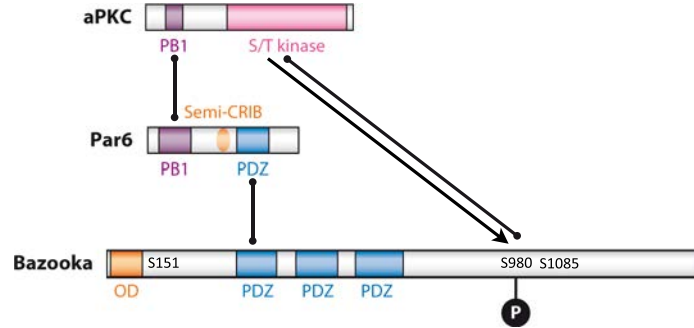


FIGURE 3 – Interactions entre les protéines du complexe PAR, adapté de [Tepass, 2012].

Les traits pleins représentent les interactions directes, la flèche représente la phosphorylation. PB1 : Phox et Bem1 Domain ; PDZ : Domaine commun à PSD95, DlgA et ZO-1 ; OD : Oligomerisation Domain ; CRIB : Cdc42/Rac Interactive Binding, S/T : Sérine/Thréonine.

1.2 Apparition de l'asymétrie

1.2.1 Le zygote du *C.elegans*

Le zygote du *C.elegans* se divise de manière asymétrique pour donner deux cellules filles différentes : un blastomère somatique antérieur, et un blastomère germinale postérieur. L'axe antéro-postérieur est acquis lors de la fécondation de l'oeuf, ou le point d'entrée du spermatozoïde, ou plus particulièrement la nucléation de microtubules par le centrosome paternel près du cortex définira le pôle postérieur. Avant l'apparition de l'asymétrie, les protéines du complexe PAR occupent tout le cortex, alors que PAR-1 et PAR-2 sont cytoplasmiques [Cuenca et al., 2003]. De même un réseau d'actine et de myosine (acto-myosine) est réparti uniformément sur le cortex (Fig 4 A à C, 0 min).

Ensuite, La mise en place de l'asymétrie dans le zygote est contrôlée par deux mécanismes redondants, tout deux liés au centrosome paternel. Lorsque le centrosome paternel s'approche du cortex postérieur, ECT-2, une GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor) de Rho1 (Fig 5), est déplétée du pôle postérieur, induisant un détachement du réseau d'acto-myosine de ce pôle. En conséquence, le réseau d'acto-myosine migre vers le pôle antérieur (Fig 4 C, 2 à 8 min). Les mécanismes impliqués dans l'inhibition de ECT-2 ne sont pas connus [Motegi and Sugimoto, 2006]. Ce mouvement du réseau d'acto-myosine semble emmener le complexe PAR avec lui vers le pôle antérieur [Munro et al., 2004] [Goehring

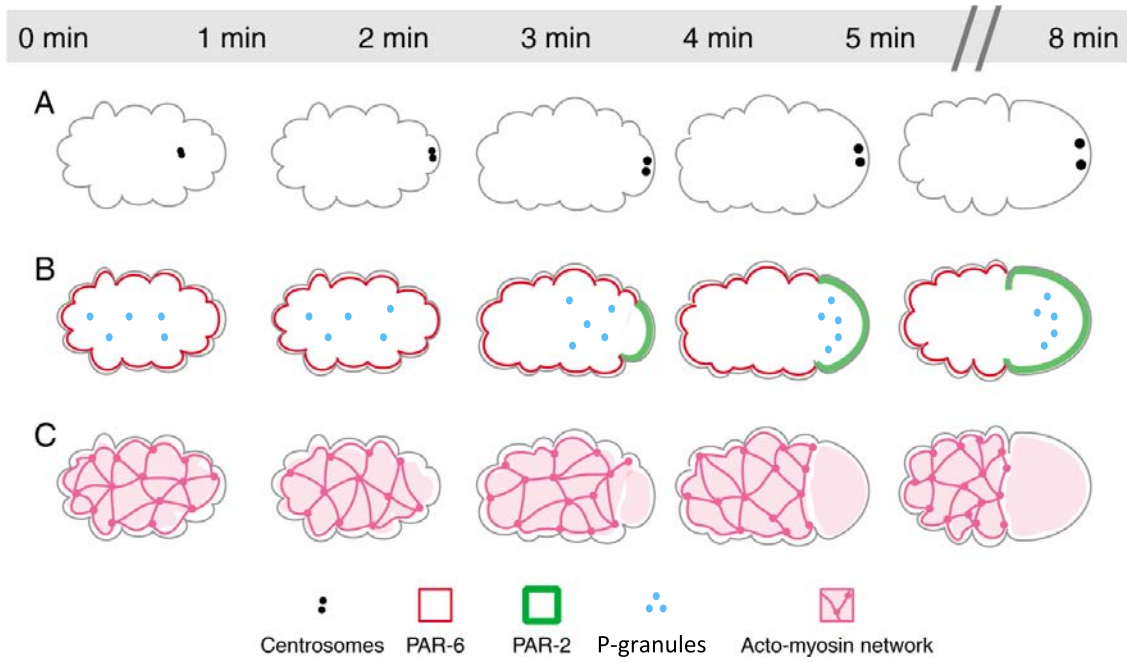


FIGURE 4 – Division asymétrique du zygote du *C.elegans*, Adapté de [Cowan and Hyman, 2007]

Division du zygote au cours du temps, **A.** Localisation des centrosomes paternels. **B.** Polarisation de PAR-6, PAR-2 et des P-granules. **C.** Mouvement du cortex d'acto-myosine vers le pôle antérieur.

et al., 2011]. PAR-4 est aussi impliquée dans ce mouvement du réseau d'actine [Chartier et al., 2011], par un mécanisme encore inconnu. Le cortex postérieur ainsi libéré du complexe PAR permet l'ancrage de PAR-1 et de PAR-2. En effet un mécanisme d'exclusion réciproque entre les protéines du complexe PAR et le complexe antérieur (que nous détaillerons plus loin) les empêchait d'avoir accès au cortex (Fig 4 C, 3 à 8 min). Le second mécanisme dépend des microtubules nucléés par le centrosome paternel. PAR-2 est capable de se lier aux microtubules, et ces derniers protègent PAR-2 de l'inhibition par le complexe PAR, permettant son association au cortex postérieur [Motegi et al., 2011]. La localisation asymétrique des protéines PAR permet la ségrégation asymétrique des P-granules vers la cellule postérieure (Fig 4 B) [Kemphues et al., 1988]. La cellule postérieure donnera naissance à la lignée germinale du *C.elegans*, cependant le rôle des P-granules dans la spécification de la lignée germinale à récemment été réévalué [Gallo et al., 2010]. Si les mécanismes conduisant à la polarisation du zygote de *C.elegans* ont été largement décrits, une des grandes inconnues de ce système reste l'identité du facteur lié au centrosome paternel permettant l'inhibition d'ECT-2 au pôle postérieur.

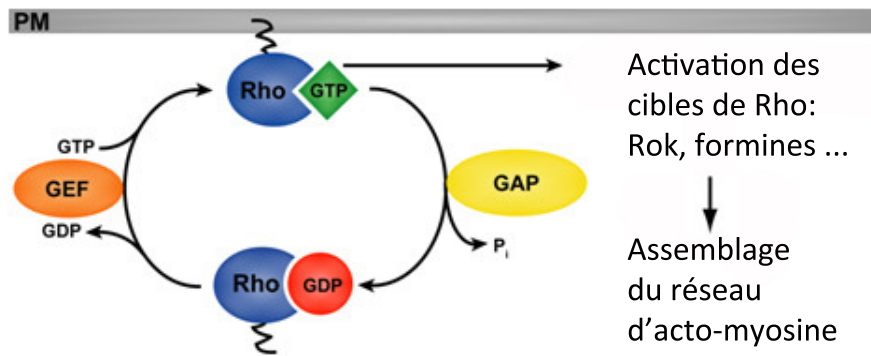


FIGURE 5 – Les Rho GTPases, adapté de <https://sites.lsa.umich.edu/miller-lab/research/>

La famille des Rho GTPases comprend les sous-familles des Rho, Rac et Cdc42, qui sont des régulateurs essentiels du cytosquelette d'actine. Elles cyclent d'une forme inactive liée au GDP à une forme active liée au GTP. Elles sont activées par les GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factor) qui catalysent l'échange GDP-GTP. L'hydrolyse du GTP en GDP est accélérée par la présence des GAPs (GTPase Activating Proteins), qui stimulent le retour à la forme inactive. Les principaux effecteurs de Rho1 sont Rho Kinase (Rok) qui phosphoryle et active MyoII, et la formine Diaphanous (Dia) qui est requise pour la nucléation et l'élongation des filaments d'actine.

1.2.2 Les neuroblastes de l'embryon de *D.melanogaster*

Les neuroblastes délaminent d'un épithélium embryonnaire : le neurectoderme, et se divisent de manière asymétrique. Cette division donnera une petite cellule basale : la GMC (Ganglion Mother Cell), une une grande cellule apicale, qui garde les caractéristiques d'un neuroblaste (Fig 6A). Les déterminants cellulaires Numb, Neuralized (Neur), Prospero (Pros) et Brat, ainsi que leurs adaptateurs Partner of Numb (Pon) et Miranda (Mira) forment un croissant au pôle basal du neuroblaste et sont distribués dans la GMC. La localisation basale de ces déterminants nécessite la formation d'une structure apicale composée du complexe PAR, mais aussi de Inscutable (Insc), Partner of inscutabale (Pins), La protéine G hétérotrimérique Gai et Discs large (Dlg) (Fig 6B). Au moment de la délimitation du neuroblaste, Baz conserve sa localisation apicale et recrute Insc [Petronczki and Knoblich, 2001] [Wodarz et al., 1999]. Ainsi ce premier neuroblaste conserve la mémoire de la polarité apico-basale du neurectoderme. En revanche le complexe apical semble démantelé pendant l'interphase entre chaque division de neuroblaste, pour se reformer en début de division. Si l'orientation de la division sur l'axe apico-basal dépend des micotubules astraux de la division précédente, ce n'est pas le cas de l'asymétrie, qui apparait même lorsque la polarisation des microtubules est inhibée [Januschke and Gonzalez, 2010]. Ainsi, les mécanismes contrôlant la mise en place de l'asymétrie dans les neuroblastes après leur première division restent entièrement inconnus.

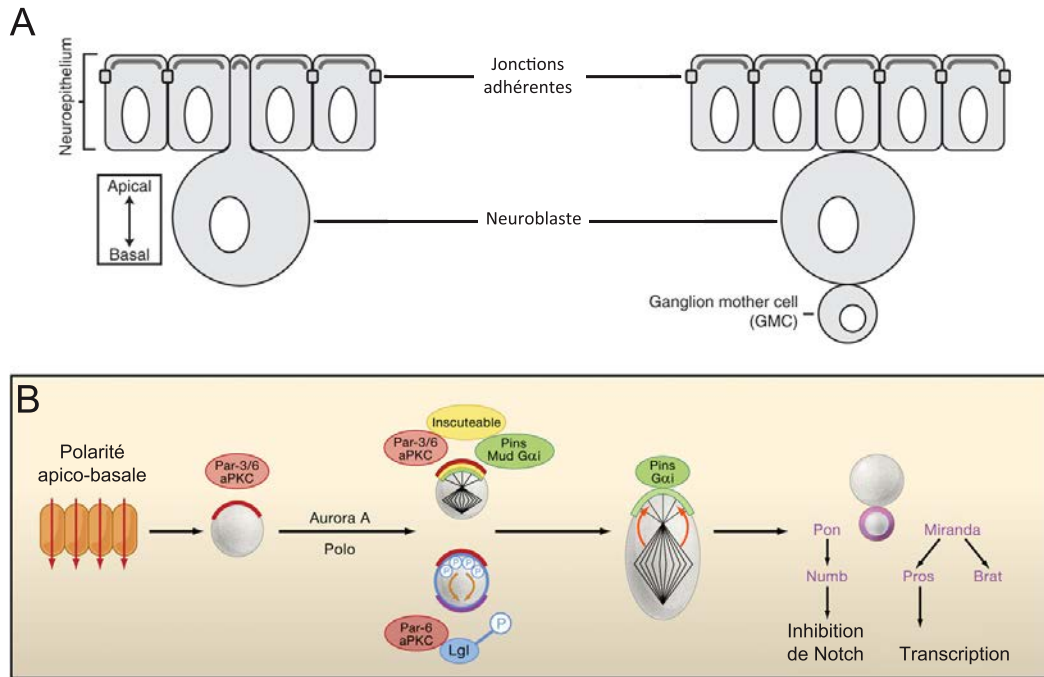


FIGURE 6 – Division asymétrique des neuroblastes de *D.melanogaster*, Adapté de [Prehoda, 2009] et [Knoblich, 2008]

A. Les neuroblastes délaminent du neuroépithélium, et conserve une mémoire de la polarité apico-basale de l'épithélium. Ils se divisent selon cet axe et donnent une grande cellule apicale qui garde les caractéristiques d'un neuroblaste, et un petite cellule basale, la GMC (Ganglion Mother Cell)

B. La mémoire de la polarité apico-basale permet la localisation apicale du complexe PAR. A l'entrée en mitose, contrôlée par les kinases mitotiques Aurora A et Polo, sont également recrutées pôle apical Inscuteable, Pins, Mud et Gai. aPKC permet la phosphorylation de Lgl au pôle apical, et la localisation basale des déterminants cellulaires. Pins, Gai et Mud orientent le fuseau mitotique le long de l'axe antéro-postérieur. La ségrégation asymétrique des déterminants cellulaires permet la spécification de la GMC. Numb inhibe la voie de signalisation Notch, et le facteur de transcription Prospero promeut la différenciation.

1.3 Recrutement au cortex des composants du complexe PAR

Bien que les protéines du complexe PAR se localisent au cortex, aucune ne possède de région transmembranaire. Leur localisation au cortex dépend donc de leurs interactions avec d'autres protéines, ou avec les lipides membranaires.

1.3.1 Localisation de Baz

Plusieurs domaines protéiques de Baz peuvent être distingués. Un domaine d'oligomérisation en C-Terminal (C-Term) et trois domaines PDZ. Le rôle de ces domaines dans la localisation asymétrique de Baz au cortex des neuroblastes à été étudié.

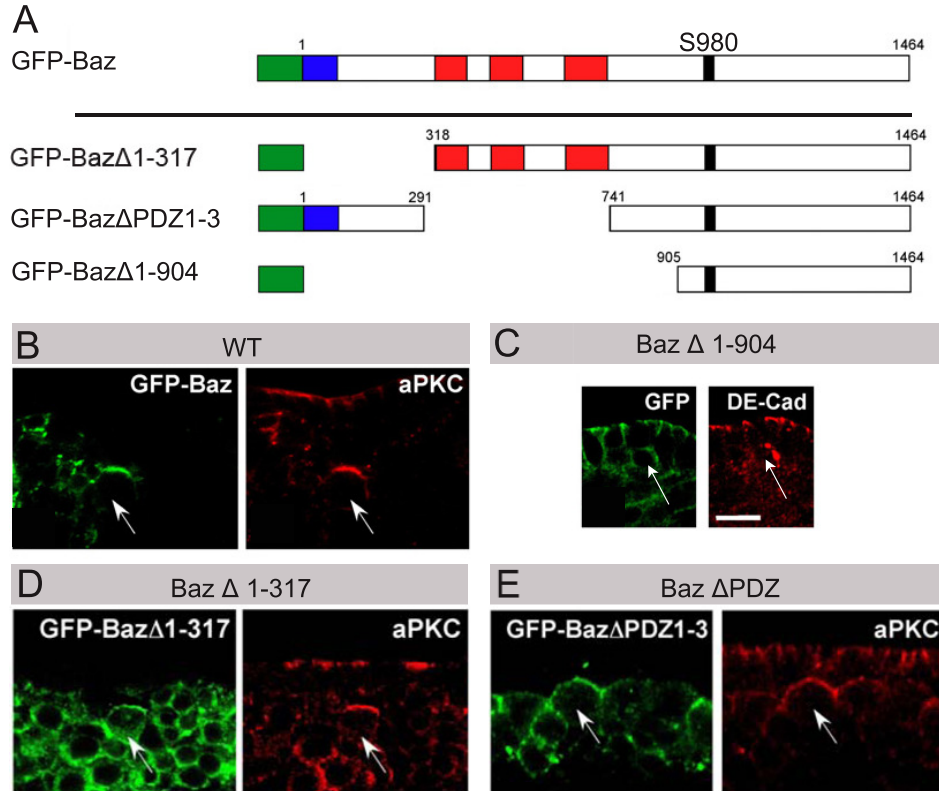


FIGURE 7 – Localisation asymétrique de Baz dans les divisions asymétriques, Adapté de [Krahn et al., 2010b]

A. Structure des constructions Baz couplée à la GFP. La GFP est représentée en vert, le domaine d'oligomérisation est en bleu, et les domaines PDZ sont en rouge. S980 est le site de phosphorylation par aPKC. Toutes ces versions de Baz sont exprimées sous le contrôle du système UAS/GAL4.

B. La version sauvage de Baz se localise asymétriquement au pôle apical, avec aPKC.

C. Le domaine C-Term de Baz est suffisant pour sa localisation membranaire.

D. La version de Baz déplétée du domaine d'oligomérisation n'est plus polarisée, en revanche la localisation d'aPKC n'est pas affectée.

E. La version de Baz déplétée de ses domaines PDZ est toujours polarisée.

Chez les mammifères, le domaine PDZ-2 participe à l'interaction de Par3 avec les phosphatidyl-inositol [Wu et al., 2007]. En revanche, chez *D.melanogaster*, les domaines PDZ ne sont pas strictement requis pour la localisation de Baz. En effet, Baz couplée à la GFP et déplétée de ses domaines PDZ montre une localisation normale dans les neuroblastes (Fig 7 E). Notons cependant qu'il s'agit d'une expérience de sur-expression dans des neuroblastes exprimant toujours la version sauvage de Baz. Nous ne pouvons donc exclure que la protéine sauvage recrute la version mutante au cortex apical.

Le domaine C-Term, est nécessaire et suffisant à la localisation au cortex de Baz, par interaction avec des phosphatidyl-inositol (PI(4)P, PI(4,5)P₂ et PI(3,4,5)P₃) (Fig 7 C), mais n'est pas suffisant pour l'asymétrie. En effet, l'expression du domaine C-Term de

Baz couplé à la GFP dans les neuroblastes sauvages montre une localisation uniforme au cortex. Dans cette expérience, le recrutement au cortex semble indépendant de la version sauvage de Baz, puisqu'un enrichissement au pôle basal de la cellule est observé là où la forme sauvage de Baz ne se localise pas.

Enfin, Baz possède un domaine d'oligomérisation en N-Terminal (N-Term) [Benton and Johnston, 2003a] qui est nécessaire à la localisation asymétrique (Fig 7D). Ainsi l'oligomérisation de Baz elle-même est probablement requise à la polarisation de la protéine dans le neuroblaste. Ce résultat est confirmé dans un autre modèle de cellule polarisée sans jonctions : l'oocyte de *D.melanogaster* [Krahn et al., 2010b]. Lorsque la version de Baz déplétée de son domaine d'oligomérisation est exprimée dans les neuroblastes, Baz devient distribuée tout autour du cortex, mais aPKC reste asymétrique (Fig 7D).

De manière intéressante, cette localisation ectopique de Baz au cortex basal n'a aucun impact sur l'asymétrie d'aPKC, alors que cette version mutante possède toujours les sites d'interactions avec aPKC et Par-6 (Fig 3). Soit la distribution polarisée d'aPKC au pôle apical est indépendante de Baz, mais nous verrons dans le prochain paragraphe que c'est peu probable, soit elle dépend du domaine d'oligomérisation de Baz, et dans cette expérience aPKC est recrutée au pôle apical par la version sauvage oligomérisée de Baz. Il est donc probable que l'asymétrie de Baz ainsi que le recrutement de aPKC au pôle apical du neuroblaste dépendent de l'oligomérisation de Baz.

Si toutes ces expériences ont apporté de nombreuses informations quand au contrôle de la localisation de Baz dans les cellules polarisées, la sur-expression de protéines mutantes dans un contexte exprimant Baz sauvage complique l'interprétation des résultats. Pour abolir ces biais d'interprétation, et répondre à la question de l'importance de l'oligomérisation de Baz dans la polarisation des neuroblastes, les mêmes expériences pourraient être reproduites dans un contexte mutant pour *baz*, et où les différentes versions mutantes de Baz seraient exprimées à un niveau endogène.

1.3.2 Localisation de Par-6 et aPKC

Deux modes de liaison de Par-6 et aPKC au cortex de nos deux modèles de divisions asymétriques peuvent être identifiés. Le premier par liaison à PAR-3, et le second via leur association à la Rho GTPase Cdc42 (Fig 5).

Chez le *C-elegans*, une interaction entre le domaine semi-crib de PAR-6 et Cdc42 a été identifiée [Aceto et al., 2006]. Cdc42 est enrichie au cortex apical des neuroblastes

de *D.melanogaster* (Fig 8A). Lorsque le domaine semi-crib de Par-6 est muté, Par-6 ne se localise plus au pôle apical du neuroblaste. La liaison de Par-6 à Cdc42 est donc indispensable à l'asymétrie de Par-6. En revanche, si l'expression de formes dominantes négatives ou constitutivement active de Cdc42 dans les neuroblastes embryonnaires affecte la localisation de Par-6 et aPKC, l'asymétrie de Baz n'est jamais perturbée (Fig 8B). Ainsi l'effet de Cdc42 sur l'asymétrie dans le neuroblaste est limité à Par-6 et aPKC. Baz étant requise pour le recrutement apical de Cdc42 (Fig 8A), elle semble réguler le recrutement apical de Par-6 et aPKC via Cdc42. La présence d'un pourcentage non négligeable de cellules où l'activité de Cdc42 est altérée mais présentant une asymétrie sauvage de Par-6 et aPKC (Fig 8B), indique l'existence de mécanismes complémentaires permettant leur polarisation dans les neuroblastes [Atwood et al., 2007].

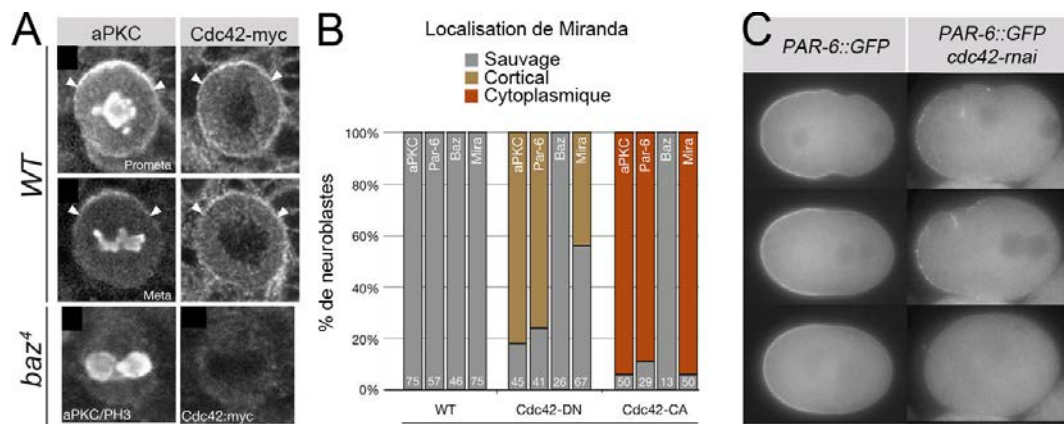


FIGURE 8 – Cdc42 dans la division asymétrique, Adapté de [Aceto et al., 2006] et de [Atwood et al., 2007]

A. Cdc42-myc (exprimé sous le contrôle du promoteur endogène de Cdc42) est apical dans les neuroblastes de *D.melanogaster*, avec aPKC. Les flèches blanches indiquent les extrémités de l'accumulation apicale. La polarisation de ces deux protéines est inhibée dans les mutants *baz*.

B. Quantification de la localisation des croissants de aPKC, Par-6, Baz et Miranda dans les neuroblastes embryonnaires sauvages ou exprimant des versions de Cdc42 dominant négatifs ou constitutivement actifs.

C. Impact de la déstabilisation de Cdc42 par ARN interférence sur la localisation de PAR-6-GFP dans la division du zygote de *C.elegans*. Dans ce contexte, l'asymétrie de PAR-6 apparaît, mais n'est pas maintenue.

Chez le zygote de *C.elegans* Cdc42 est uniformément localisée. Contrairement à ce qui est observé dans les neuroblastes, lorsque Cdc42 est absent, PAR-6 devient tout de même asymétrique au cortex, mais cette asymétrie n'est pas maintenue. De plus le signal PAR-6 au cortex est moins "lisse" que chez le sauvage [Aceto et al., 2006] (Fig 8C).

Dans ces deux modèles de divisions asymétriques, Cdc42 participe à la localisation asymétrique de Par-6. Notons aussi que, puisque Cdc42 est une Rho GTPase, elle oscille

entre une forme active et inactive (respectivement couplée à la GTP et à la GDP)(Fig 5). Dans les neuroblastes de *D.melanogaster*, l'expression d'une forme constitutivement couplée à la GTP affecte la localisation au cortex de Par-6 et aPKC (Fig 8B). Ainsi la régulation de l'équilibre entre les deux formes de Cdc42 est aussi importante que la présence de la protéine.

1.4 Interactions entre le complexe PAR et les autres protéines de polarité

1.4.1 PAR-2, PAR-5 et Par1

Chez le zygote du *C.elegans*, l'asymétrie est établie suite au mouvement du réseau d'acto-myosine, et à l'ancrage de PAR-2 au pôle postérieur. Pour que cette asymétrie soit conservée, il existe un mécanisme d'exclusion réciproque entre les PAR antérieures et les PAR postérieures. Ainsi, PAR-2, PAR-1 et LGL sont des cibles de phosphorylation de la kinase PKC-3, et leur phosphorylation les excluent du cortex [Hao et al., 2006] [Hoegel et al., 2010]. De la même façon, PAR-3 est une cible de PAR-1 et cette phosphorylation joue un rôle dans l'exclusion du complexe PAR du cortex postérieur [Motegi et al., 2011].

L'absence de PAR-5 n'affecte pas l'association au cortex des PAR antérieures et postérieures, mais affecte leur exclusion réciproque. En effet, dans les mutants *par-5*, les PAR antérieures envahissent le domaine postérieur et vice-versa [Morton et al., 2002], mais les mécanismes par lesquels PAR-5 joue sur la polarité du zygote du *C.elegans* sont inconnus. Cependant, PAR-5 faisant parti de la famille des 14-3-3, qui se lient à des motifs contenant des sérines phosphorylées, il est possible que PAR-5 ait pour cible d'autres protéines PAR, et que sa fixation altère leur association avec le cortex. C'est d'ailleurs par un mécanisme de ce type que l'homologue de PAR-5 chez la Drosophile agit dans les cellules épithéliales (les détails de ces mécanismes seront discutés dans le chapitre suivant).

1.4.2 Lgl

Lgl est un régulateur majeur des divisions asymétriques mais semble tenir des rôles différents selon le modèle étudié.

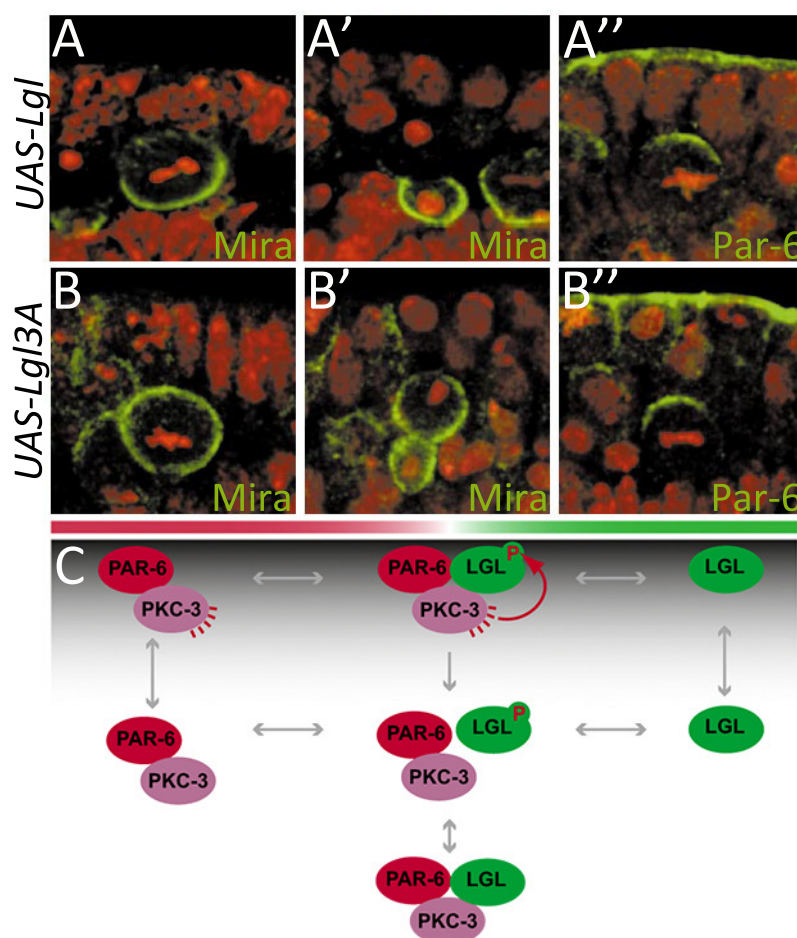


FIGURE 9 – La phosphorylation de Lgl dans les divisions asymétriques, Adapté de [Hoege et al., 2010] et de [Betschinger et al., 2003]

A-A''. La polarisation de Miranda et de Par-6 n'est pas affectée par la surexpression de Lgl dans les neuroblastes de *D.melanogaster*.

B-B''. Miranda n'est plus asymétrique lors de la surexpression de la version de Lgl non phosphorylable. En revanche, la localisation de Par-6 n'est pas affectée.

C. Modèle de la dynamique de phosphorylation de LGL-1 à la frontière des deux domaines corticaux dans le zygote du *C.elegans*. LGL-1 et le complexe PAR diffusent à la membrane, et s'excluent mutuellement à la frontière des deux domaines. L'association de LGL-1 avec PAR-6-PKC-3 conduit à la phosphorylation de LGL-1. LGL-1 ne peut plus s'associer au cortex, les trois protéines sont donc relarguées dans le cytoplasme.

Dans le zygote du *C.elegans*, LGL-1 se localise au pôle postérieur. Sa localisation est contrôlée par PKC-3 qui le phosphoryle et le détache du cortex. Ainsi le complexe PAR participe à l'asymétrie de LGL-1. Inversement, LGL-1 agit de manière redondante avec PAR-2 pour exclure le complexe PAR du cortex postérieur. [Hoege et al., 2010] proposent un modèle selon lequel à l'interface entre les domaines antérieurs et postérieur LGL-1 non phosphorylée et corticale forme un complexe avec PAR-6 et PKC-3. La formation de ce complexe induit la phosphorylation de LGL-1 et le décrochage du complexe LGL-1-PAR-

6-PKC-3 du cortex. La frontière entre les deux domaines corticaux est donc maintenue grâce à cette interaction (Fig 9C). Ainsi, la phosphorylation dynamique de LGL-1 par PKC-3 est indispensable au maintien de l'asymétrie.

Bien que chez *D.melanogaster* Lgl soit aussi une cible de aPKC, et que la phosphorylation de Lgl la rende cytoplasmique dans les cellules S2, Lgl est présent tout autour du cortex dans les neuroblastes (Fig 6B) [Ohshiro et al., 2000] [Peng et al., 2000]. Les mécanismes maintenant Lgl au cortex apical dans ce système sont encore inconnus. Dans les mutants *lgl*, le complexe PAR se localise normalement, mais la localisation des déterminants basaux est affectée. La dynamique de phosphorylation de Lgl est également importante pour l'asymétrie du neuroblaste. En effet, la surexpression d'une version non phosphorylable de Lgl dans les neuroblastes induit le recrutement ectopique tout autour du cortex des déterminants cellulaires, sans pour autant affecter la localisation de Par-6 (Fig 9A,B) [Betschinger et al., 2003]. [Wirtz-Peitz et al., 2008] proposent que le rôle de Lgl dans le neuroblaste soit de réduire l'activité kinase d'aPKC envers les déterminants cellulaires. Lgl, en se liant à Par-6-aPKC empêcherait la formation du complexe PAR. Allant dans le sens de cette hypothèse, l'inhibition de *baz* par ARN interférence sauve le phénotype de localisation de Numb des mutants *lgl*. Cependant, le fait que la surexpression de Lgl dans les neuroblastes n'affecte pas la distribution polarisée de Miranda va à l'encontre de cette hypothèse [Betschinger et al., 2003].

Lgl joue un rôle important dans les divisions asymétriques du zygote de *C.elegans* et des neuroblastes de *D.melanogaster*. Mais sa fonction diffère d'un modèle à l'autre. Dans le premier, Lgl est impliquée dans l'asymétrie du complexe PAR au pôle antérieur alors que dans le second, c'est son rôle dans l'ancrage des déterminants cellulaires au pôle basal qui prédomine. En revanche, dans les deux modèles, la régulation de sa phosphorylation par aPKC est indispensable au bon déroulement de la division.

1.5 Complexe PAR : réalité ou simplification ?

Dans ces deux modèles de divisions asymétriques, Baz, Par-6 et aPKC se localisent asymétriquement à un pôle de la cellule et participent à la polarisation des déterminants cellulaires. Pendant la division des neuroblastes de *D.melanogaster*, l'activité kinase d'aPKC est requise pour la ségrégation asymétrique des déterminants cellulaires [Rolls et al., 2003], probablement par phosphorylation directe de Numb, Miranda et Neuralized [Smith et al., 2007] [Atwood and Prehoda, 2009]. Or, il a été proposé que l'activité kinase d'aPKC envers ces protéines dépend de son association avec Baz et Par-6 [Wirtz-Peitz et al., 2008].

De plus, la présence simultanée des ces trois protéines est nécessaire à la polarisation du zygote de *C.elegans* [Tabuse et al., 1998]. C'est pourquoi Par3, Par-6 et aPKC sont regroupées sous le concept de "complexe PAR". Cependant, l'action conjointe de ces trois protéines n'est pas toujours évidente.

1.5.1 Colocalisation des protéines du complexe PAR

Si on s'intéresse à la localisation de ces trois protéines dans le zygote du *C.elegans*, PAR-6 et PKC-3 ne colocalisent pas toujours avec PAR-3. En effet, au pôle antérieur seulement 65% des signaux PAR-6 colocalisent avec les signaux PAR-3. Ce chiffre passe à 90% dans un contexte ARN interférence contre *cdc42* (Fig 10A-F). Ces résultats indiquent qu'au pôle antérieur du zygote de *C.elegans*, Par-6 n'est pas toujours associée à PAR-3, mais est aussi associée à Cdc-42. [Beers and Kemphues, 2006].

Dans les neuroblastes de *D.melanogaster*, la situation est différente. Cdc42 est impliquée dans l'asymétrie de Par-6 et aPKC, mais pas dans celle de Baz [Atwood et al., 2007]. En effet une majorité de neuroblastes larvaires mutants pour *cdc42* affichent une accumulation apicale de Baz, non accompagnée d'une asymétrie de Par-6 ou aPKC. Ces résultats indiquent que l'asymétrie de Baz ne dépend pas de celle de Par-6 et aPKC. Appuyant cette hypothèse, la mutation d'*aPKC* dans les neuroblastes larvaires n'affecte pas l'asymétrie de Baz (Fig 10 G), mais uniquement celle de Par-6 (Fig 10 H) [Rolls et al., 2003].

1.5.2 Activité du complexe PAR

L'activité du complexe PAR est généralement assimilée à l'activité kinase d'aPKC. Or, son activité kinase dépend de ses partenaires. Ainsi, quand aPKC est intégrée dans le complexe PAR, il phosphoryle le déterminant cellulaire Numb, alors que dans le complexe aPKC-Par-6-Lgl, aPKC ne le phosphoryle pas [Wirtz-Peitz et al., 2008]. Si de nombreuses cibles d'aPKC ont été répertoriées (PAR-2, PAR-1, Lgl ...), nous ne distinguons pas toujours quel complexe est à l'origine de ces différentes phosphorylations. Dans [Graybill et al., 2012], ce type d'étude est amorcé. Cet article montre que aPKC seule n'a qu'une faible activité kinase, mais que son association avec Par-6 permet son activation. Pour faire cette démonstration, les auteurs ont effectué une purification très sélective d'aPKC. Cette donnée contredit plusieurs études plus anciennes suggérant que Par-6 était un inhibiteur de l'activité kinase d'aPKC [Yamanaka et al., 2001], [Atwood et al., 2007], notion largement reprise dans de nombreuses études. Dans ces études aPKC avait été purifiée par immunoprécipitation, nous ne pouvons donc pas exclure que la protéine n'avait pas été précipitée seule. Comprendre les conséquences moléculaires de l'association d'aPKC

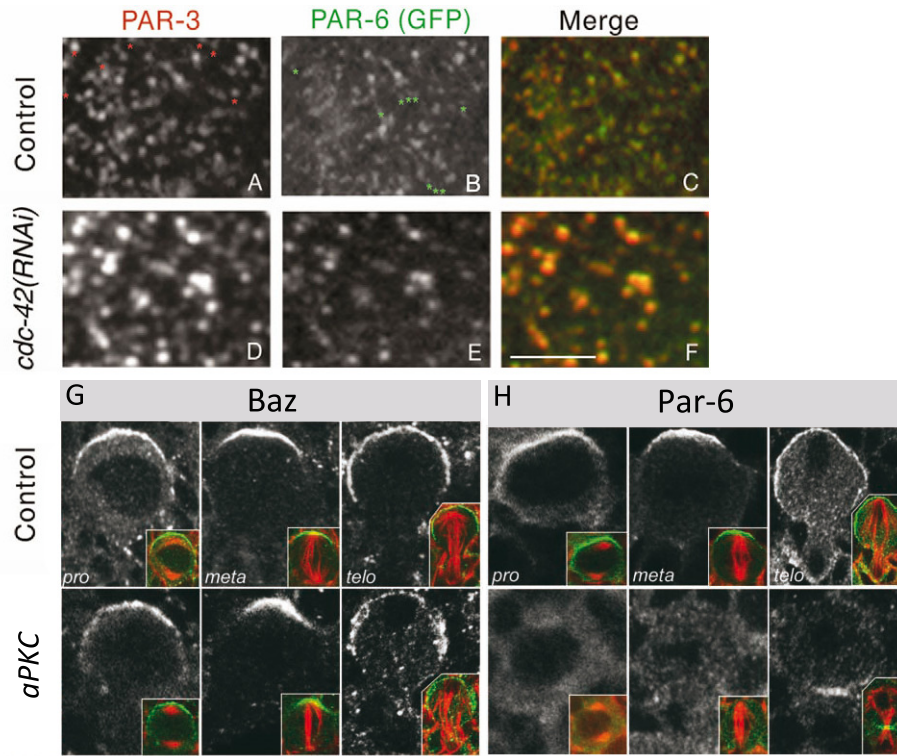


FIGURE 10 – Localisations de Par-6-aPKC et de Baz , Adapté de [Beers and Kemphues, 2006] et de [Rolls et al., 2003]

A-C. Au cortex antérieur des embryons du *C.elegans*, 65% des signaux PAR-6 colocalisent avec des signaux PAR-3.

C-F. Dans un contexte où Cdc42 est déplété, 90% des signaux au cortex PAR-6 colocalisent avec des signaux PAR-3 au cortex antérieur.

G. Dans les neuroblastes larvaires mutants pour *aPKC* de *D.melanogaster*, Baz forme un croissant apical, comme chez le sauvage.

H. Le recrutement au pôle apical de Par-6 est abolit dans les neuroblastes larvaires mutants *aPKC* de *D.melanogaster*.

avec ces différents interacteurs, conséquence sur son activité kinase et sur la spécificité de ses substrats, pourrait faire avancer notre compréhension des mécanismes contrôlant les divisions asymétriques.

1.6 Conclusion sur le complexe PAR dans les divisions asymétriques

Dans les deux modèles de divisions asymétriques développés ici, si Baz, Par-6 et aPKC forment bien un complexe, nous pourrions subdiviser ce complexe en deux composantes avec Baz d'une part, et Par-6-aPKC d'autre part. En effet ces deux composantes ne se polarisent pas toujours grâce aux mêmes mécanismes, notamment dans le neuroblaste ou

la polarisation de Baz semble être indépendante de celle de Par-6-aPKC. De plus, ces deux composantes ne colocalisent pas toujours dans le zygote du *C.elegans* (Fig 10 A-E). L'activité kinase d'aPKC semble être au centre du processus de polarisation. En effet, PKC-3 est requise pour l'exclusion des PAR antérieures dans le zygote du *C.elegans*, et dans les deux modèles de divisions asymétriques décrits ici, la phosphorylation de Lgl par aPKC est nécessaire au bon déroulement de la division. En revanche, nous ne pouvons savoir à ce jour si cette activité d'aPKC est dépendante ou non de son association avec Baz et Par-6.

La division asymétrique est un mécanisme robuste aux perturbations génétiques. En effet, dans la SOP et les neuroblastes de *D.melanogaster*, il existe un mécanisme dit de "sauvetage en télophase". Certains génotypes perturbent fortement la polarisation de la cellule en métaphase, mais les déterminants cellulaires sont tout de même correctement ségrégés dans une seule des deux cellules filles au moment de l'anaphase. Par exemple, dans les neuroblastes mutants *baz*, il n'y a pas d'asymétrie de Prospero en métaphase, mais le déterminant cellulaire sera tout de même hérité par la GMC en télophase [Wodarz et al., 1999]. En revanche, dans les mutants *aPKC*, même si Baz est asymétrique, aucun sauvetage n'est observé [Rolls et al., 2003], montrant l'importance de l'activité d'aPKC dans ce type de division. Ces sauvetages en télophase montrent qu'il n'existe pas un mécanisme unique permettant la mise en place d'un axe de polarité, mais une multitude, agissant en parallèle pour assurer la transmission des déterminants cellulaires dans une seule des deux cellules filles.

Chapitre 2

La polarité épithéliale

Les cellules épithéliales sont polarisées sur un axe apico-basal, et leur cortex est organisé en trois domaines. Tout comme dans les divisions asymétriques discutées plus haut, leur polarisation repose sur les protéines PAR, qui s'associent avec un jeu de protéines propres aux épithéliums. Les relations entre les protéines PAR sont donc modifiées, et les composantes du complexe PAR ne sont pas localisées au même domaine du cortex. En effet, Par-6 et aPKC se localisent au domaine apical, alors que Baz est recrutée au niveau des jonctions. Cette observation a été faite dans l'épithélium embryonnaire [Harris and Peifer, 2005], mais aussi dans l'épithélium folliculaire [Morais-de Sá et al., 2010] et enfin dans les cellules photoréceptrices de l'oeil [Walther and Pichaud, 2010].

Notons qu'au cours de la mise en place de la polarité épithéliale, la distinction entre le domaine jonctionnel et le domaine apical n'est pas aussi claire, et les protéines du complexe PAR sont regroupées dans un même domaine. Ainsi, la distinction entre les domaines apicaux et jonctionnels n'est visible que dans les épithéliums matures.

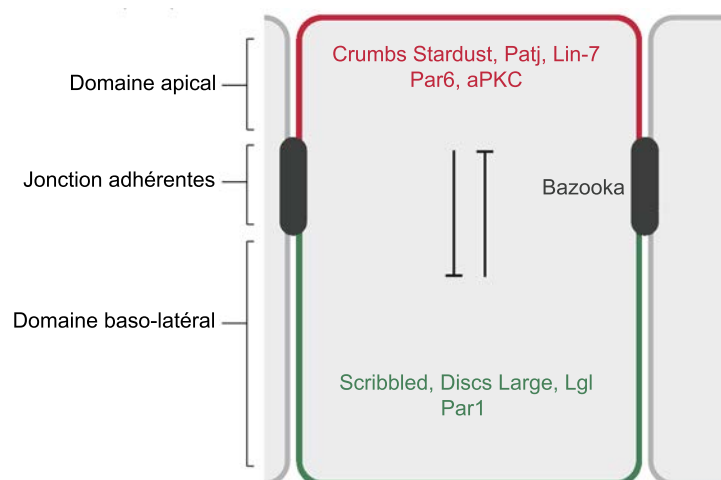


FIGURE 11 – Complexes apicaux et baso-latéraux, adapté de [Tepass, 2012]

Les cellules des épithéliums classiquement étudiés chez la *Drosophile* sont donc organisées en trois domaines. Un domaine apical où se localisent les protéines Crumbs (Crb), Patj, Stardust (Sdt) et Lin-7, formant le "complexe apical", auquel se joignent Par-6 et aPKC (Fig 11). Aux jonctions adhérentes, se concentrent les protéines d'adhésion Cadhérines (E-Cad) et Echinoid (Ed), ainsi que Baz, et un domaine baso-lateral, où se localisent Scribbled (Scrib), Discs large (Dlg), Lgl et Par-1 (Fig 11), (pour revue [St Johnston and Ahringer, 2010]).

Dans ce chapitre, après avoir brièvement décrit l'organisation du domaine jonctionnel, je présenterai les protéines de polarité auxquelles s'associent les protéines PAR. Ensuite nous développerons le rôle des composantes du complexe PAR dans les épithéliums pour terminer ce chapitre sur un autre type de polarité épithéliale : la polarité planaire.

2.1 Le domaine jonctionnel

2.1.1 Description des jonctions adhérentes

Les cellules épithéliales sont reliées entre elles par différents types de jonctions. Les "jonctions serrées" (chez les Vertébrés) ou "jonctions septées" (chez les Invertébrés), assurent les transports para-cellulaires et trans-cellulaires, respectivement d'une cellule à l'autre et entre les cellules. L'autre type de jonctions est responsable de l'adhésion entre les cellules, ce sont les jonctions adhérentes. Si l'organisation des jonctions le long de l'axe apico-basal diffère entre la *Drosophile* et les Mammifères (Fig 12), la régulation de leurs jonctions adhérentes est comparable.

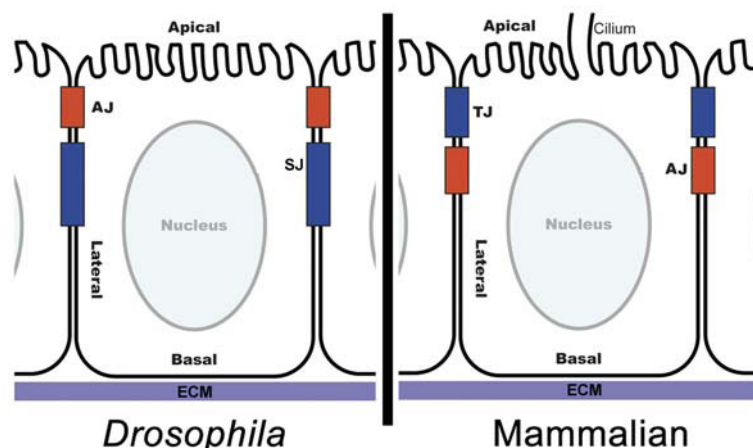


FIGURE 12 – Organisation des jonctions chez la *Drosophile* et les Mammifères, adapté de [Bergstrahl and St Johnston, 2012]

Chez la *Drosophile*, les AJ sont apicales aux jonctions septées. Chez les mammifères, les jonctions serrées sont apicales aux AJ. *SJ* : *septate junctions*, *TJ* : *tight-junctions* (*Jonctions serrées*)

Les jonctions adhérentes (AJ) sont composées de molécules d'adhésion, protéines transmembranaire dont les domaines extra-cellulaires interagissent, établissant une cohésion entre deux cellules voisines. Les AJs sont aussi reliées au réseau d'actine par leur domaine intracellulaire. La composition des AJ est extrêmement régulée, permettant la formation de jonctions adhérentes stables, ou au contraire dynamiques, selon les besoins du tissu. Deux types de molécules d'adhésions sont retrouvées aux jonctions adhérentes de la *Drosophile* : les Cadhérines (Cad) et Echinoid (Ed, Nectine chez les mammifères).

Les Cadhérines classiques (dont E-Cad pour *Epithelial Cadherin*, fait partie) possèdent un domaine intracellulaire extrêmement conservé, permettant l'ancrage aux AJ du réseau d'actine. En effet, ce domaine intracellulaire interagit avec un jeu de protéines cytoplasmiques appelées Caténines, et ces dernières sont reliées au réseau d'actine. Ainsi, une ceinture de filaments d'actines linéaires se forme au niveau du domaine jonctionnel (Fig 13) (Pour revue [Takeichi, 2014]).

Comme nous l'avons évoqué plus haut, Baz est localisée aux jonctions des cellules épithéliales. Ce recrutement se fait par liaison de Baz au domaine C-Term de la β -caténine (β -cat), ou par liaison à la protéine d'adhésion Ed. E-Cad et Ed assurent ensemble le maintien des jonctions et ont un rôle redondant dans le recrutement de Baz aux jonctions [Wei et al., 2005].

2.1.2 Régulation de l'endocytose de E-Cad

L'adhésion entre deux cellules est possible grâce aux interactions homophiliques des domaines extracellulaires d'E-Cad et de Ed. Dans certains contextes, les jonctions doivent pouvoir être remodelées, c'est à dire pouvoir diminuer et/ou augmenter l'adhésion entre une cellule et ses voisines. Cette plasticité des jonctions est notamment requise dans tous les mouvements de morphogenèse, ou l'organisation des cellules les unes par rapport aux autres est modifié. Ainsi, si les Cadhérines sont localisées à la membrane pour assurer leur rôle d'adhésion, la plasticité des jonctions est assurée par la régulation de leurs endocytose. En effet, les cellules endothéliales dont les Cadhérines ne peuvent être endocytées affichent un défaut de migration [Nanes et al., 2012], et les mouvements d'épibolie dans la gastrulation de l'embryon du poisson zèbre sont altérés. [Song et al., 2013]. L'importance de l'endocytose des Cadhérines dans la plasticité des jonctions est conservée chez les invertébrés. Lors de l'extension de la bande germinale de l'embryon de *D.melanogaster*, un réarrangement des cellules de l'épithélium embryonnaire, appelé intercalation des cellules, est observé. Ici aussi, l'endocytose d'E-Cad est nécessaire [Levayer et al., 2011].

Chez les mammifères, p120-caténine est un régulateur majeur de ce phénomène. En effet, p120 se fixe au VE-Cadhérines (Vascular Endothelial Cadherin) sur le site de recon-

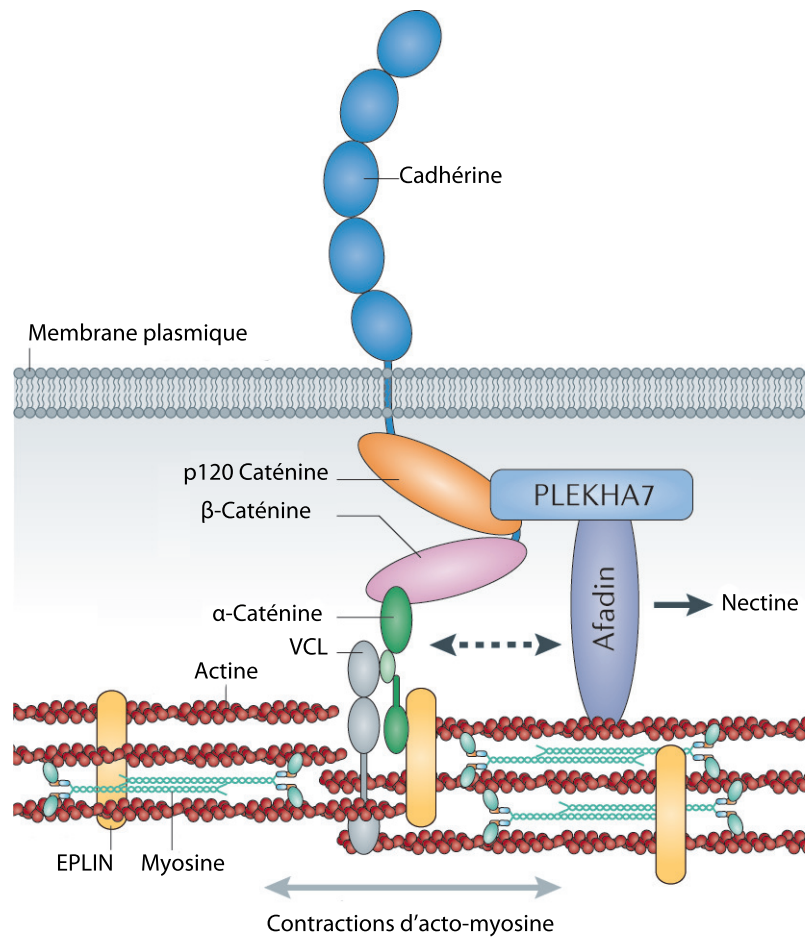


FIGURE 13 – Organisation des jonctions adhérentes, adapté de [Takeichi, 2014]

Le domaine intracellulaire de la Cadhérine est associée à p120-Caténine et à β -Caténine. α -caténine lie β -caténine à l'actine, probablement grâce à la Vinculine (VCL) qui la maintient dans la conformation requise. PLEKHA7 (PH Domain-containing family A member-7) relie Afadin (Canoe chez la Drosophile), et p120-Caténine. Afadin/Canoe se lie également aux Nectines (Echinoid chez la Drosophile). EPLIN relie les filaments d'actine, permettant leur stabilisation aux jonctions.

naissance de la machinerie d'endocytose. Ainsi la caténine masque ce site, et la Cadhérine n'est pas endocytée. Pour les E-Cad, un site similaire a été identifié et joue probablement le même rôle. [Nanes et al., 2012]. En revanche, le rôle de p120 chez la Drosophile est beaucoup moins clair. Dans ce modèle, p120 se lie aussi au domaine intracellulaire de Cadhérine, mais les mutants *p120* sont complètement viables et fertiles, contrairement aux mutants *β -catenin* ou *E-Cad*, qui sont léthaux au stade embryonnaire. De plus, la localisation de β -catenin, α -catenin et E-Cad ne semble pas affectée dans les mutants *p120*. Cependant les mutants *p120* amplifient les phénotypes de défauts de cuticules provoqués par une diminution de β -catenin ou de E-Cad, indiquant que p120 est tout de même associée à la régulation des AJs [Myster et al., 2003]. Ainsi, si la caténine p120 est essentielle chez les Vertébrés, des mécanismes redondants semblent exister chez les

Invertébrés. Le rôle de p120 dans l'inhibition de l'endocytose de E-Cad reste à explorer chez la *Drosophile*.

2.1.3 Régulation de la ceinture d'actine par les petites GTPases

La ceinture d'actine a deux rôles fondamentaux : le maintien des AJs, mais aussi leur contraction lors du remodelage des épithéliums. Ainsi, de nombreux facteurs régulent cette ceinture d'actine, les principaux étant les petites GTPases Rho et RAP1. Rho promeut la polymérisation de l'actine en activant la formine Diaphanous, ainsi que la contraction du réseau d'actine en activant Rho kinase (Rok), qui a son tour phosphoryle et active la myosine. RAP1 est notamment capable d'interagir et d'activer Afadin (Canoe chez la *drosophile*). Or, Afadin se lie à p120 et promeut son association aux cadhérines (pour revue [Takeichi, 2014]).

2.2 Les PAR s'associent à d'autres protéines de polarité

Traditionnellement, les protéines de la polarité épithéliale sont regroupées en deux complexes : Le complexe apical et le domaine baso-latéral. Si les protéines PAR sont toujours au coeur de l'organisation de ce type de polarité, les protéines de polarité propres aux épithéliums sont tout aussi essentielles.

2.2.1 Le domaine apical

Parmi les protéines de la polarité épithéliale, Crumbs est la seule protéine transmembranaire. Elle est composée d'un grand domaine extra-cellulaire, et d'une petite région intracellulaire de 37 acides aminés. La région intracellulaire contient deux motifs conservés : un domaine de liaison aux FERM, et un domaine de liaison au PDZ, le motif ERLI. Ce motif ERLI permet une liaison avec les domaines PDZ de Par-6 [Kempkens et al., 2006] et de Sdt [Bachmann et al., 2001] [Hong et al., 2001] (Fig 14 A).

Crumbs fut identifiée comme régulateur de la polarité épithéliale [Tepass et al., 1990], et plus particulièrement comme garant de l'identité apicale. En effet, les épithéliums mutants *crumbs* perdent leur pôle apical [Wodarz et al., 1993], tandis que la surexpression de Crumbs provoque l'agrandissement du domaine apical [Wodarz et al., 1995]. Dans l'embryon, l'absence de Sdt provoque le même phénotype qu'un mutant *crumbs* [Tepass and Knust, 1993] [Bachmann et al., 2001]. Si Crumbs, Stardust et Patj peuvent former un complexe, le rôle de Patj ne semble pas essentiel à la polarité épithéliale puisque les mutants survivent jusqu'au stade pupal. [Zhou and Hong, 2012] [Pénalva and Mirouse, 2012] [Sen et al., 2012]. De la même façon, les mutants *lin-7* sont viables et fertiles, et ne

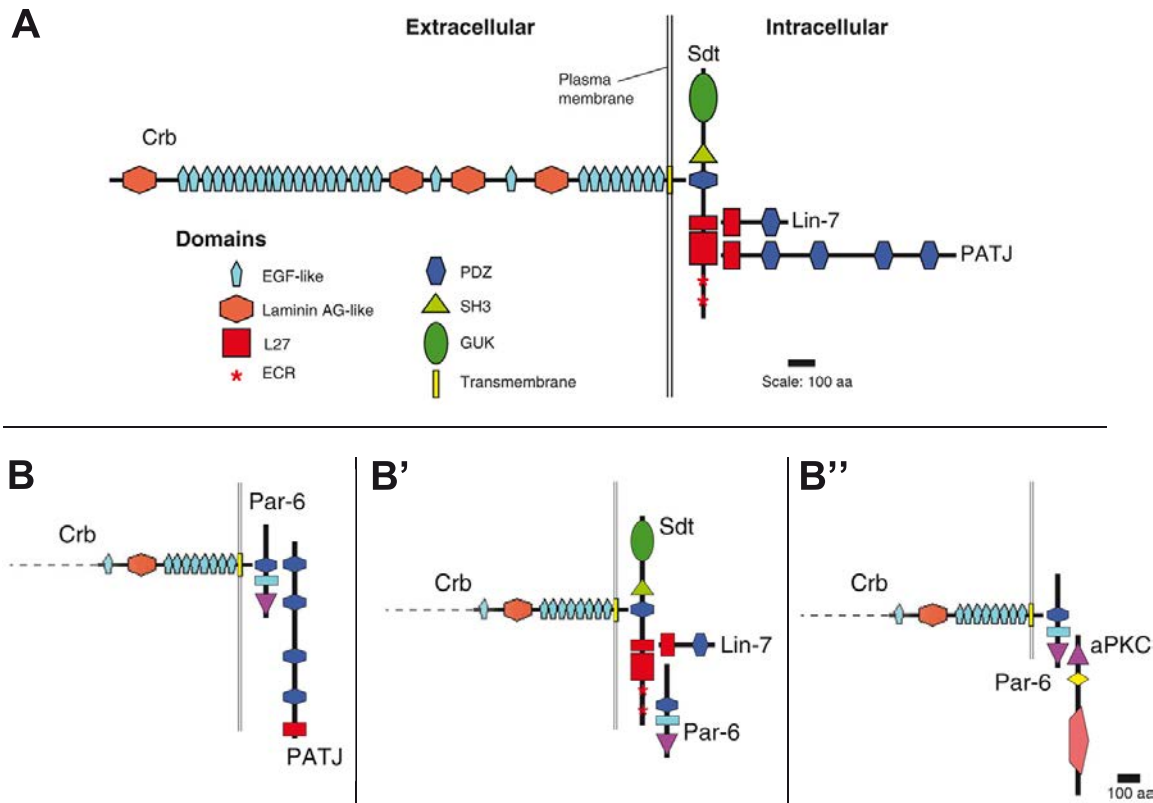


FIGURE 14 – Les multiples complexes apicaux, adapté de [Tepass, 2012] et de [Bulgakova and Knust, 2009]

A. Structure théorique du complexe apical. **B-B''.** Structures théoriques du complexe apical après recrutement de Par6. (B) Par-6 peut lier Crumbs et Patj sans que Stardust soit recruté. (B) Par-6 peut se lier à Stardust, et inhiber la liaison Sdt-Patj. (B'') Par-6 peut lier Crumbs et aPKC sans recruter d'autres facteurs.

perturbent pas la localisation des autres membres du complexe apical [Bachmann et al., 2008].

Par-6 et aPKC sont présents au domaine apical. Par-6 peut interagir avec Crumbs, mais aussi avec Stardust et Patj. De ce fait, plusieurs complexes apicaux peuvent être imaginés (Fig 14 B-B''). Il est difficile d'appréhender la composition réelle du domaine apical *in vivo*. Il existe vraisemblablement une multitude de complexes apicaux, cohabitant les uns avec les autres. La diversité des complexes pouvant être formés est d'autant plus grande que certaines de ces protéines présentent de nombreuses isoformes (14 pour Sdt et 12 pour aPKC). Chaque cellule présente probablement un équilibre des différents complexes apicaux, équilibre évoluant selon le type cellulaire, le tissu, et selon les contraintes environnementales et développementales.

2.2.2 Le domaine baso-latéral

Au domaine baso-latéral se localisent les protéines Scrib, Dlg, Lgl et Par-1. Même si aucune interaction directe n'a été identifiée entre ces protéines, leurs interactions génétiques les ont regroupées sous le nom de complexe baso-latéral. Le complexe baso-latéral est un inhibiteur de la polarité apicale. En effet, les mutants *Lgl*, *scrib* ou *dlg* déclenchent une extension du domaine apical dans l'épiderme embryonnaire. De manière intéressante, les doubles mutants zygotiques et maternels *sdt*, *dlg* ou *crb*, *scrib* ont le même phénotype que les mutants *Lgl*, *scrib* ou *dlg* seuls, c'est à dire une extension du domaine apical. Ce résultat nous donne une information cruciale : l'inhibition de la polarité apicale par les protéines du complexe baso-latéral semble indépendante des protéines du complexe apical. Cette conclusion est cependant à modérer puisque toutes les protéines du complexe apical ne sont pas absentes en même temps dans ces expériences. L'épiderme des embryons mutants maternels et zygotiques pour *baz* montrent de sévères défauts, le niveau de Crumbs est fortement diminué et la distribution des protéines Crumbs n'est pas polarisée : le domaine apical ne semble pas se former correctement. Or, ce phénotype est inchangé par la mutation des gènes du complexe baso-latéral, contrairement à ce qu'il se passe dans les mutants du complexe apical. Ainsi, l'action inhibitrice du complexe baso-latéral sur le complexe apical semble se faire via Baz [Bilder et al., 2003] [Tanentzapf and Tepass, 2003]. En revanche les mécanismes moléculaires impliqués dans cette inhibition restent inconnus.

2.3 Les protéines PAR dans la polarité apico-basale

Au cours des dernières années, l'étude de plusieurs épithéliums de *D.melanogaster* montre une dissociation de la localisation de Par-6-aPKC d'une part et de Baz d'autre part (Fig 16A-A'' et B-B''). En effet, au cours de la maturation des jonctions de l'épithélium embryonnaire, les trois protéines colocalisent apicalement, avant de se séparer en deux domaines distincts : Par-6 et aPKC sont au domaine apical, associées à Crumbs, alors que Baz reste au niveau des jonctions [Harris and Peifer, 2005]. Une réorganisation similaire est observée lors de la morphogenèse des photorécepteurs [Walther and Pichaud, 2010] et dans les cellules folliculaires [Morais-de Sá et al., 2010].

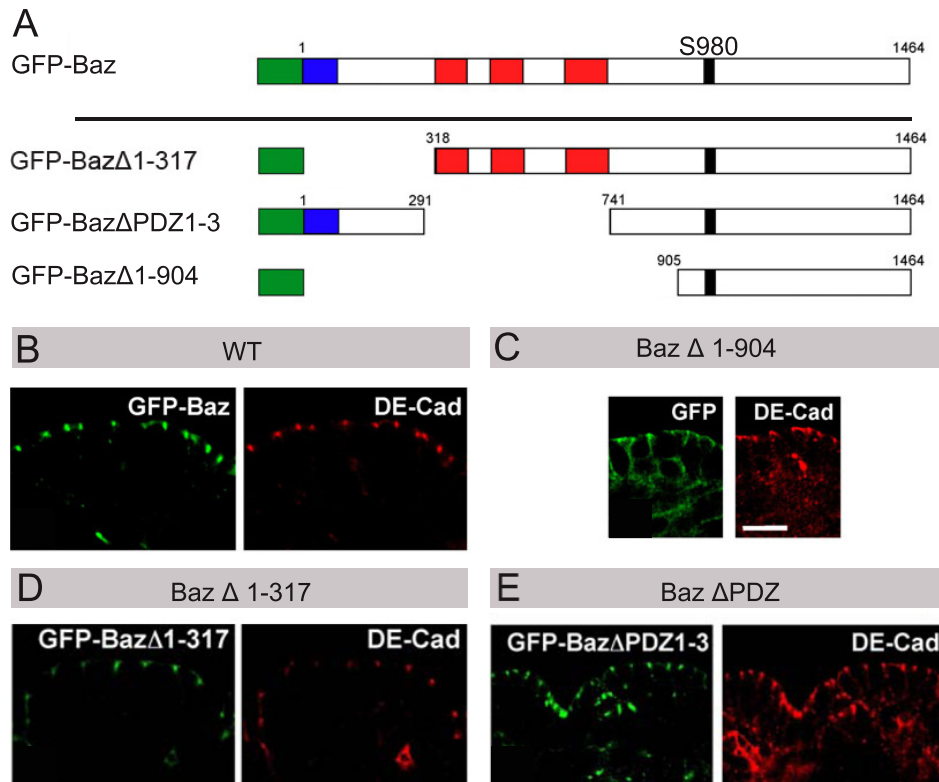


FIGURE 15 – Localisation de Baz aux jonctions dans l'épithélium embryonnaire, Adapté de [Krahn et al., 2010b]

A. Structure des constructions Baz couplée à la GFP. La GFP est représentée en vert, le domaine d'oligomérisation est en bleu, et les domaines PDZ sont en rouge. S980 est le site de phosphorylation par aPKC. Toutes ces versions de Baz sont exprimées sous le contrôle du système UAS/GAL4.

B. La version sauvage de Baz se localise aux jonctions des cellules épithéliales.

C. Le domaine C-Term de Baz est suffisant pour sa localisation membranaire, mais pas pour sa localisation aux jonctions.

D. La version de Baz déplétée du domaine d'oligomérisation se localise aux jonctions.

E. La version de Baz déplétée de ses domaines PDZ se localise aux jonctions.

2.3.1 Localisation au cortex des composants du complexe PAR dans les cellules épithéliales

Localisation de Baz aux jonctions

Dans le chapitre précédent nous avons évoqué le rôle des différents domaines de Baz dans sa localisation dans les neuroblastes. Dans les cellules épithéliales, tout comme dans les neuroblastes, le domaine C-Term est requis et suffisant pour la localisation de Baz à la membrane, par liaison aux phosphatidyl-inositol (Fig 15C). En revanche la phosphorylation de ce domaine par Rok exclue Baz du cortex [Simões et al., 2010].

Les domaines PDZ de Baz interagissent directement avec les protéines jonctionnelles β cat et Ed [Wei et al., 2005]. Baz peut-donc être recrutée aux jonctions par ses domaines

PDZ. Dans l'ectoderme embryonnaire, les domaines PDZ et la région d'oligomérisation de Baz semblent redondant pour la localisation aux jonctions. En effet, l'expression d'une version couplée à la GFP de Baz, déplétée de l'un ou l'autre de ces domaines n'affecte pas sa localisation aux jonctions (Fig 15 D et E). En revanche, la déplétion simultanée des deux domaines inhibe la localisation aux jonctions (Fig 15 C) [Krahn et al., 2010b]. Mais ici encore, il s'agit d'une sur-expression dans un épithélium exprimant toujours la version sauvage de Baz, compliquant l'analyse des résultats. Nous pourrions cependant les expliquer de la manière suivante : Baz déplétée de ses domaines PDZ peut s'associer aux jonctions par oligomérisation avec la protéines Baz sauvage, alors que la version déplétée du domaine d'oligomérisation s'associe aux jonctions par liaison directe avec β -caténine et Echinoid.

Localisation de Par6-aPKC au pôle apical

Par-6 peut se lier aux protéines du complexe apical Crumbs, Stardust et Patj. Par6 et aPKC peuvent donc être recrutées au pôle apical par liaison directe au complexe apical. Dans la première partie de notre introduction, nous avons évoqué la liaison de Par6 à Cdc42 et l'importance de cette interaction dans la polarisation des cellules. Cdc42 est également exprimée dans les épithéliums.

Dans l'épithélium dorsal du thorax de la puppe de *Drosophile* (le notum), des clones mutants *cdc42* ont été observés. Dans ces cellules mutantes, les niveaux de Par-6 et aPKC baissent drastiquement et les protéines ne se localisent plus au pôle apical, mais semblent diffuses dans le cytoplasme, pendant que Crumbs, Stardust et Patj sont délocalisées dans des vésicules proches du cortex apical [Leibfried et al., 2008] [Georgiou et al., 2008]. En effet, Cdc42 est un régulateur négatif de l'endocytose de Crumbs [Harris and Tepass, 2008]. Dans les clones mutants *cdc42* du notum, les protéines d'adhésion E-Cad et β -cat mais aussi Baz forment des jonctions discontinues. Seul les protéines baso-latérales ne semblent pas affectées par la perte de Cdc42. Notons tout de même qu'à terme les clones *cdc42* délaminent et disparaissent de l'épithélium [Leibfried et al., 2008] [Georgiou et al., 2008]. Ainsi, dans les épithéliums, Cdc42 joue aussi un rôle majeur dans la localisation de Par6-aPKC, mais aussi pour la localisation du complexe apical Crumbs.

2.3.2 Le domaine apical et la séparation des protéines du complexe PAR

Baz peut être recrutée aux jonctions par β -cat et Ed, et Par6-aPKC au pôle apical par Crumbs. Mais comment sont dissociées les deux composantes du complexe PAR ? Pourquoi Baz n'est-elle pas recrutée au pôle apical par Par6 et aPKC et inversement ? La séparation

des deux composantes du complexe PAR dépend de deux mécanismes complémentaires : la phosphorylation de la sérine-980 de Baz par aPKC, ainsi que la régulation des interactions protéiques entre les membres du complexe PAR, et les membres du complexe apical.

Phosphorylation de Baz sur la sérine S980 par aPKC

La régulation de l'activité kinase d'aPKC est primordiale dans le maintien de la polarité épithéliale. Ainsi, l'expression d'une forme d'aPKC associée à la membrane par addition d'une séquence CAAX, donne un phénotype similaire à celui d'une surexpression de Crumbs : le domaine apical s'étend tout autour de la cellule. En revanche, la surexpression de cette même protéine, mais dont le domaine kinase est altéré (aPKC-CAAX-K293W), présente le phénotype inverse. Les protéines du domaine apical disparaissent, pendant que le domaine baso-latéral s'étend [Sotillos et al., 2004].

Des tests d'activité kinase in vitro ont identifié la sérine 980 de Baz comme cible d'aPKC [Walther and Pichaud, 2010] [Morais-de Sá et al., 2010], et la capacité de Baz à être phosphorylée sur cette sérine est également essentielle à la localisation de Baz aux jonctions ainsi qu'au maintien de la polarité épithéliale. En effet la version non phosphorylable de Baz (Baz-S980A) envahit le domaine apical dans les cellules folliculaires. Inversement, la version phosphomimétique (Baz-S980E) se localise correctement au domaine jonctionnel [Morais-de Sá et al., 2010]. Au cours de la morphogénèse des photorécepteurs de l'oeil de *D.melanogaster*, un remodelage de la polarité apico-basale a lieu. Avant le remodelage, les cellules possèdent un domaine apical contenant les protéines Crumbs, Stardust et Patj, mais aussi Par-6, Baz et aPKC, ainsi que les protéines d'adhésion Cadhérine et β -cat. Suite au remodelage de la polarité de ces cellules, deux nouveaux domaines apparaissent : un domaine apical comprenant le complexe Crumbs, Par-6 et aPKC, et un domaine jonctionnel regroupant Baz, Cadhérine et β -cat. Dans ce système aussi, la forme phosphomimétique (Baz-S980E) se localise correctement au domaine jonctionnel (Fig 16C-C') , alors que l'expression de la forme non phosphorylable provoque une superposition des domaines jonctionnels et apicaux (Fig 16D-D').

De plus, dans l'épithélium embryonnaire, les clones *baz* sont sauvés par l'expression de la version phosphomimétique de Baz, mais pas par sa version non phosphorylable. La phosphorylation de Baz altère sa liaison avec aPKC chez les mammifères, et chez la drosophile, l'immunoprécipitation de BAZ-S980A précipite une plus grande quantité de aPKC que les versions WT et phosphomimétique. Toutes ces analyses montrent que la phosphorylation de Baz par aPKC provoque la séparation de Par-6-aPKC et de Baz.

Au cours de la formation des jonctions de l'épithélium embryonnaire, une interaction entre Sdt et Baz a aussi été mise en évidence, sur un domaine de Baz correspondant au site de liaison et de phosphorylation par aPKC [Krahn et al., 2010a]. De même la phosphorylation de Baz par aPKC inhibe son interaction avec Sdt. Ainsi le rôle de la phosphorylation de Baz par aPKC est aussi d'inhiber son interaction avec Sdt, et donc d'éviter le recrutement de Baz au pôle apical.

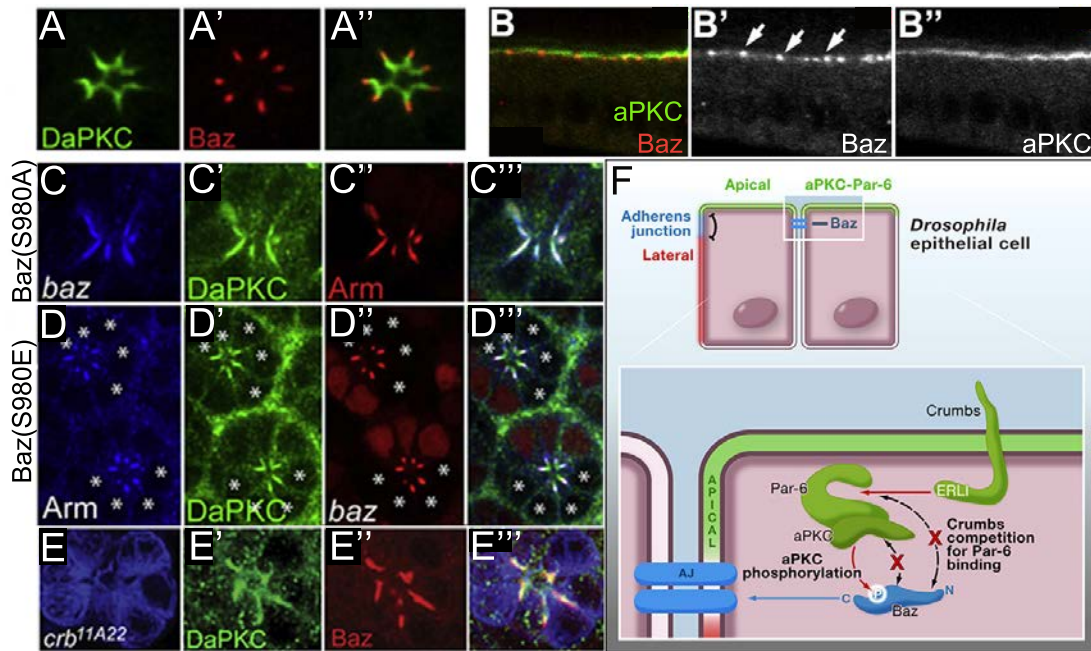


FIGURE 16 – Exclusion de Baz du domaine apical, adapté de [Walther and Pichaud, 2010] et de [Morais-de Sá et al., 2010]

A-A'' Localisation de Baz et aPKC dans les cellules photoreceptrices de l'oeil. Les deux protéines se localisent dans deux domaines distincts.

B-B'' Localisation de Baz et aPKC dans les cellules folliculaires. aPKC se localise au niveau de la surface apicale des cellules, Baz se localise au niveau des jonctions entre les cellules.

C-C'' L'expression d'une forme non-phosphorylable de Baz perturbe l'organisation de la polarité dans les cellules photoreceptrices. Baz, aPKC et Arm se localisent dans un même domaine.

D-D'' L'expression d'une forme phosphomimétique de Baz ne perturbe pas l'organisation de la polarité. Baz et Arm colocalisent au domaine jonctionnel, aPKC est exclue de ce domaine.

E-E'' Dans les mutants *crumbs*, Baz et aPKC colocalisent dans des cellules photoreceptrices très désorganisées.

F. Modèle de l'exclusion de Baz du domaine apical dans les cellules épithéliales. Par-6 et aPKC sont recrutées au pôle apical par liaison directe entre Par-6 et Crumbs. La liaison de Crumbs à Par6 inhibe la liaison de Par-6 avec Baz. De plus, la phosphorylation de Baz par aPKC inhibe sa liaison à aPKC.

Interactions inhibitrices

Dans [Harris and Peifer, 2005], l'hypothèse que Crumbs était requis pour séparer aPKC-Par-6 et Baz avait été avancée. En effet, dans les mutants *crumbs* de l'épithélium

embryonnaire, Par-6 et aPKC ne sont plus séparés de Baz, et s'accumulent avec elle au niveau des quelques jonctions restantes de cet épithélium mutant.

Dans les cellules photoreceptrices de l'oeil, l'absence de Sdt ou de Crumbs provoque une superposition partielle des domaines apicaux et jonctionnels (Fig 16E-E’’). Or, une quantité de Baz phosphorylée sur la S980 est détectée en colocalisation avec Par-6 et aPKC dans ces domaines superposés, indiquant que cette phosphorylation n'est pas suffisante pour exclure Baz du domaine apical, mais que l'intégrité du complexe apical joue aussi un rôle. [Walther and Pichaud, 2010]

De plus, si la phosphorylation de Baz par aPKC inhibe l'interaction entre les deux protéines, Baz interagit aussi avec Par-6. Ainsi, la phosphorylation de Baz par aPKC n'explique pas l'absence de liaison entre Par-6 et Baz. Par-6 est associée à Crumbs au pôle apical des cellules épithéliales, et cette liaison n'est pas responsable de l'activité kinase d'aPKC sur Baz. En effet, la phosphorylation de Baz est toujours détectable en l'absence de Crumbs. Il existe donc un autre mécanisme permettant l'exclusion de Baz de Par-6 et aPKC. Crumbs et Baz interagissent avec Par-6 via le même domaine PB1, et une compétition entre Crumbs et Baz pour la liaison à Par-6 a donc été recherchée et démontrée par une expérience de GST pull-down. L'interaction Baz-Par-6 diminue lorsque Crumbs est ajoutée dans le milieu de réaction [Morais-de Sá et al., 2010].

Ainsi, Baz est exclue du domaine apical où se localisent Par-6 et aPKC par deux mécanismes essentiels : l'inhibition de la liaison de Baz à aPKC est inhibée par la phosphorylation de Baz par aPKC elle-même, et l'interaction entre Crumbs et Par-6 empêche la liaison de Baz à Par-6. Ainsi Baz ne peut plus se lier ni à Par-6, ni à aPKC, la protéine est exclue du cortex. (Fig 16F)

2.3.3 Le domaine basolatéral et l'exclusion des protéines Par

Comme nous l'avons évoqué plus haut, Par-1 est localisée au domaine baso-latéral. Les protéines 14-3-3 (homologues de PAR-5 chez *C.elegans*) reconnaissent et se fixent sur des sites contenant des sérines phosphorylées, et l'activité kinase de Par-1 est capable de créer de tels sites [Benton et al., 2002]. Dans les cellules folliculaires de Drosophile, Par-1 et 14-3-3 participent à la régulation de la polarité apico-basale. En effet, Baz possède deux sérines susceptibles d'être phosphorylées par Par-1 : S151 et S1085, toutes deux formant des sites de fixation à 14-3-3.

L'expression d'une version non phosphorylable de Baz pour ces deux sites provoque une délocalisation de Baz vers le domaine latéral (Fig 17A-D), entraînant avec elle aPKC. En effet, la sérine 1085 est proche du site de fixation d'aPKC. Et une étude *in vitro* a

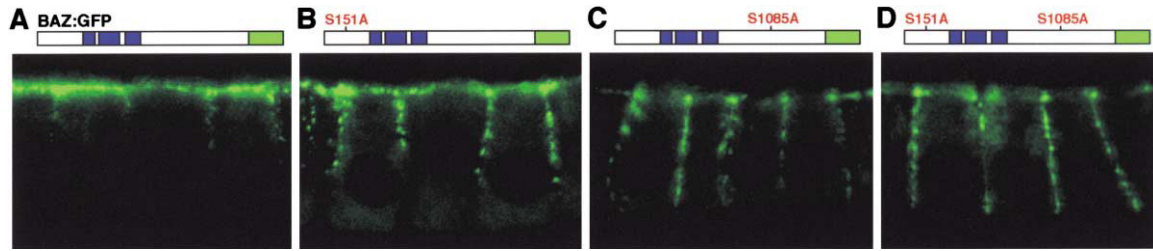


FIGURE 17 – Exclusion de Baz du domaine basolatéral par Par-1, adapté de [Benton and Johnston, 2003b]

A-D Expression de la protéine Baz couplée à la GFP dans les cellules folliculaires de *Drosophile*, grâce au système UAS/GAL4.

A. La version sauvage de Baz se localise au pôle apical dans les cellules folliculaires.

B-D. Les versions non phosphorylables de Baz envahissent les domaines baso-latéraux des cellules folliculaires.

permis de montrer que la liaison de 14-3-3 sur ce site empêche l'accès d'aPKC à Baz. Ainsi Par-1 et 14-3-3 affectent aussi la formation du complexe PAR, mais ici depuis le domaine baso-latéral. Nous avons évoqué plus haut l'importance du domaine d'oligomérisation de Baz pour la localisation asymétrique de la protéine pendant les divisions asymétriques. Or, la liaison de 14-3-3 sur le site S151 inhibe l'oligomérisation de Baz [Benton and Johnston, 2003b]. Ainsi, la régulation de la phosphorylation de Baz sur la S151 et/ou la liaison des 14-3-3 sur ce site doivent vraisemblablement être inhibées ou contrôlées lors des divisions asymétriques. La phosphatase hétérotrimérique PP2A pourrait être responsable du contrôle de l'activité de Par-1 dans le neuroblaste. En effet, PP2A se lit aux différents membres du complexe PAR et cible spécifiquement les sites de phosphorylation de Par-1 sur Baz [Ogawa et al., 2009] [Chabu and Doe, 2009] [Krahn et al., 2009] [Wang et al., 2009]. Ainsi Par-1 semble être un régulateur majeur de la localisation de Baz dans les cellules épithéliales. En revanche son rôle n'a été étudié que dans un seul épithélium, celui des cellules folliculaires de *Drosophile*. L'importance de Par-1 dans la régulation de la localisation de Baz semble être conservée dans la division asymétrique du *C.elegans* et dans la mise en place de la polarité antéro-postérieure dans l'oocyte de *Drosophile*.

2.4 Régulation et fonctions de Crumbs

Ces dernières années, de nombreuses études se sont focalisées sur la protéine apicale Crumbs, qui en plus de dévoiler les rouages de sa régulation dans les cellules épithéliales, ont mis en évidence son rôle dans des mécanismes extérieurs à la polarité, comme la croissance cellulaire ou la voie de signalisation Notch.

2.4.1 Régulation de Crumbs dans les cellules épithéliales

Phosphorylation de Crumbs par aPKC

Crumbs possède deux sites de phosphorylation par aPKC, deux tyrosines situées dans son domaine de liaison aux FERM. La phosphorylation de ces tyrosines est nécessaire au maintien de Crumbs au domaine apical. En effet, l'expression d'une forme non phosphorylable de Crumbs dans l'épithélium embryonnaire provoque sa délocalisation dans le cytoplasme. A l'inverse, la forme phosphomimétique reste en partie associée à la membrane. Cependant, la version phosphomimétique se localise moins bien à la membrane que la version sauvage, et l'expression des formes non-phosphorylable et phosphomimétique semble perturber l'organisation de l'épithélium. Ainsi, plus que la phosphorylation de Crumbs par aPKC, c'est la dynamique de cette phosphorylation qui semble être importante pour la localisation de Crumbs [Sotillos et al., 2004].

Régulation de l'endocytose de Crumbs par Cdc42 et aPKC

Dans le neurectoderme de l'embryon, de nombreuses cellules épithéliales délaminent pour devenir des neuroblastes, ce qui sous-entend une grande plasticité des jonctions dans cet épithélium. En effet, un remodelage des jonctions est nécessaire à la fois pour que les cellules puissent délaminer, mais aussi pour que les cellules restantes reforment des jonctions. Cdc42 est requis dans le neurectoderme ventral pour ce réarrangement de jonctions. Dans ce système, l'expression d'une forme dominante négative de Cdc42 induit une augmentation de l'endocytose de Crumbs (Fig 18BB'-CC'), et cette endocytose est sauvée par l'expression d'une version constitutivement active d'aPKC [Harris and Tepass, 2008]. Ainsi la présence de Cdc42 dans les épithéliums inhibe l'endocytose de Crumbs, et cette inhibition est dépendante d'aPKC.

Ainsi, un modèle pourrait être avancé, où le recrutement de Par6-aPKC par Cdc42 favoriserait l'interaction Crumbs-aPKC, et donc la phosphorylation de Crumbs. Enfin, cette phosphorylation inhiberait son endocytose [Harris and Tepass, 2008]. Ce modèle est soutenu par la localisation dans des vésicules cytoplasmiques de la version non phosphorylable de Crumbs dans les cellules folliculaires [Fletcher et al., 2012].

Régulation du trafic de Crumbs

Si son endocytose excessive déstabilise les épithéliums [Harris and Tepass, 2008], Crumbs est observée dans des endosomes de recyclage (positifs pour Rab11, Fig 18DD'-EE') dans des épithéliums sauvages [Roeth et al., 2009]. Ainsi Crumbs n'est pas statique à la membrane apicale mais trafic dans la cellule. Plus récemment, Crumbs a été identifiée comme cargo du transport rétrograde (ou Retromer) (Fig 18A). En effet, chez les

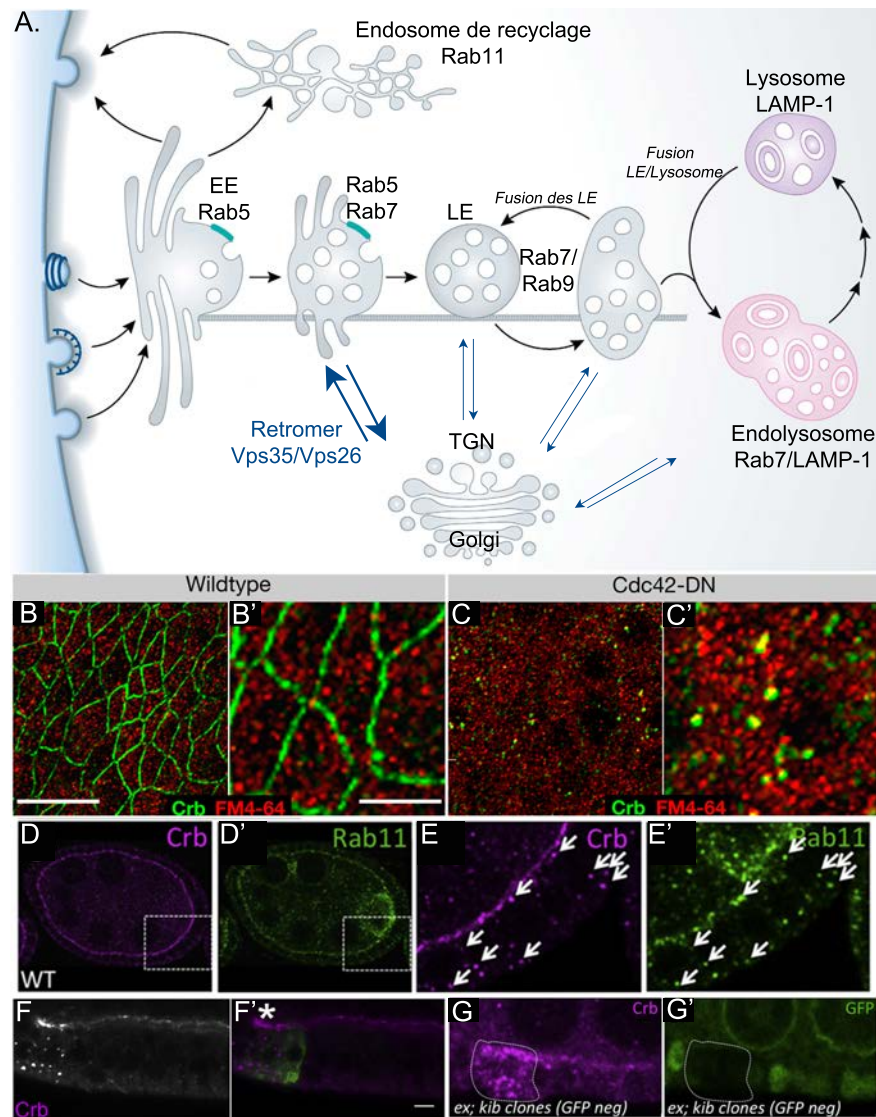


FIGURE 18 – Trafic intracellulaire de Crumbs, adapté de [Huotari and Helenius, 2011], [Harris and Tepass, 2008], [Fletcher et al., 2012] et [Pocha et al., 2011]

A. Les produits de l'endocytose sont relâchés dans des endosomes précoces (EE pour Early Endosomes). Certains cargo seront rapidement recyclés vers la membrane par les endosomes de recyclage. Les autres restent dans les endosomes précoces qui peu à peu, fusionnent avec des endosomes tardifs (LE pour Late Endosomes). Au moment de la conversion des endosomes précoces en endosomes tardifs, certains cargo sont reconnus par le Retromer, et plus particulièrement par ses composantes Vps35 et Vps26. Le Retromer emmène ces cargos vers l'appareil de Golgi. Les cargos seront ensuite réenvoyés vers les endosomes, ou vers la membrane plasmique. Les endosomes tardifs fusionnent avec les Lysosomes, ou les cargos restant seront dégradés.

B-C' L'expression d'une forme dominante négative de Cdc42 dans le neur ectoderme de *Drosophila* provoque l'endocytose de Crumbs. FM4-64 est un marqueur d'endocytose.

D-E' Dans les cellules folliculaires de *Drosophila*, Crumbs colocalise avec le marqueur d'endosome de recyclage Rab11. E-E' est un agrandissement de la région encadrée en D-D'.

F-F' Cellules folliculaires traitées avec un inhibiteur de protéases lysosomales. Crumbs est apical dans les cellules sauvages, mais s'accumule dans des endosomes dans le clone mutant pour *vps35* (marqués par la GFP).

G-G' Les clones doubles mutants *ex,kibra* dans les cellules folliculaires présentent une forte accumulation de Crumbs dans le cytoplasme.

Mammifères et chez la *Drosophile*, une interaction entre Vps35 et Vps26, les sous-unités du Retromer reconnaissant les cargo, et Crumbs a été mise en évidence [Pocha et al., 2011], [Zhou et al., 2011]. Ce trafic de Crumbs par le Retromer semble être requis pour sa localisation, car l'inhibition de *vps35* dans les cellules folliculaires diminue l'accumulation de Crumbs au pôle apical. Ce phénotype est certainement dû à une dégradation de Crumbs, car l'inhibition de l'activité lysosomale dans ces cellules montre Crumbs accumulée dans des vésicules cytoplasmiques [Pocha et al., 2011] (Fig 18FF'). Ainsi, Crumbs serait endocytée puis recyclée via le Retromer vers la membrane apicale dans les épithéliums sauvages, et l'inhibition de ce recyclage provoque la dégradation de Crumbs.

Un complexe de protéines à domaine FERM est impliqué dans la régulation du trafic de Crumbs. En effet, les protéines Expanded (Ex), Kibra (Kib) et Merlin (Mer) forment un complexe [Yu et al., 2010] et Ex interagit avec Crumbs *via* son domaine de liaison aux FERM [Ling et al., 2010]. L'observation de clones doubles mutants *ex*, *kib* dans l'épithélium folliculaire montre une délocalisation de Crumbs dans des vésicules (Fig 18 GG') [Fletcher et al., 2012]. Malheureusement, ces structures ne furent pas analysées en détail, nous ne pouvons donc savoir si Expanded et Kibra régulent le trafic de Crumbs par le retromer, par les endosomes de recyclages Rab11, ou par une autre voie. Si Expanded inhibe l'endocytose de Crumbs, Crumbs opère elle-même un rétrocontrôle sur sa régulation par Ex. En effet, Crumbs promeut la phosphorylation d'Expanded par une kinase aujourd'hui encore inconnue, et cette phosphorylation entraîne la dégradation d'Ex *via* une E3-ubiquitin ligase [Ribeiro et al., 2014].

Chez les mammifères, Kibra interagit avec Ex, mais aussi avec aPKC, et semble inhiber l'activité kinase d'aPKC [Yoshihama et al., 2011]. L'impact de Kibra sur l'activité kinase d'aPKC chez la *Drosophile* reste à développer, mais les protéines FERM Kibra et Expanded, impliquées à la fois dans la stabilité de Crumbs et dans la régulation de l'activité kinase d'aPKC établissent une connexion intéressante entre les protéines PAR et la régulation de Crumbs.

2.4.2 Crumbs et ses multiples fonctions

Pendant longtemps, l'analyse de Crumbs fut limitée à son domaine intracellulaire. En effet, la surexpression de ce dernier est suffisante au sauvetage des embryons mutants pour *crumbs* [Wodarz et al., 1995]. Ces trois dernières années, différentes fonctions ont été attribuées au domaine extracellulaire de Crumbs, certaines associées à la polarité cellulaire, d'autres dans des domaines plus éloignés (Fig 19).

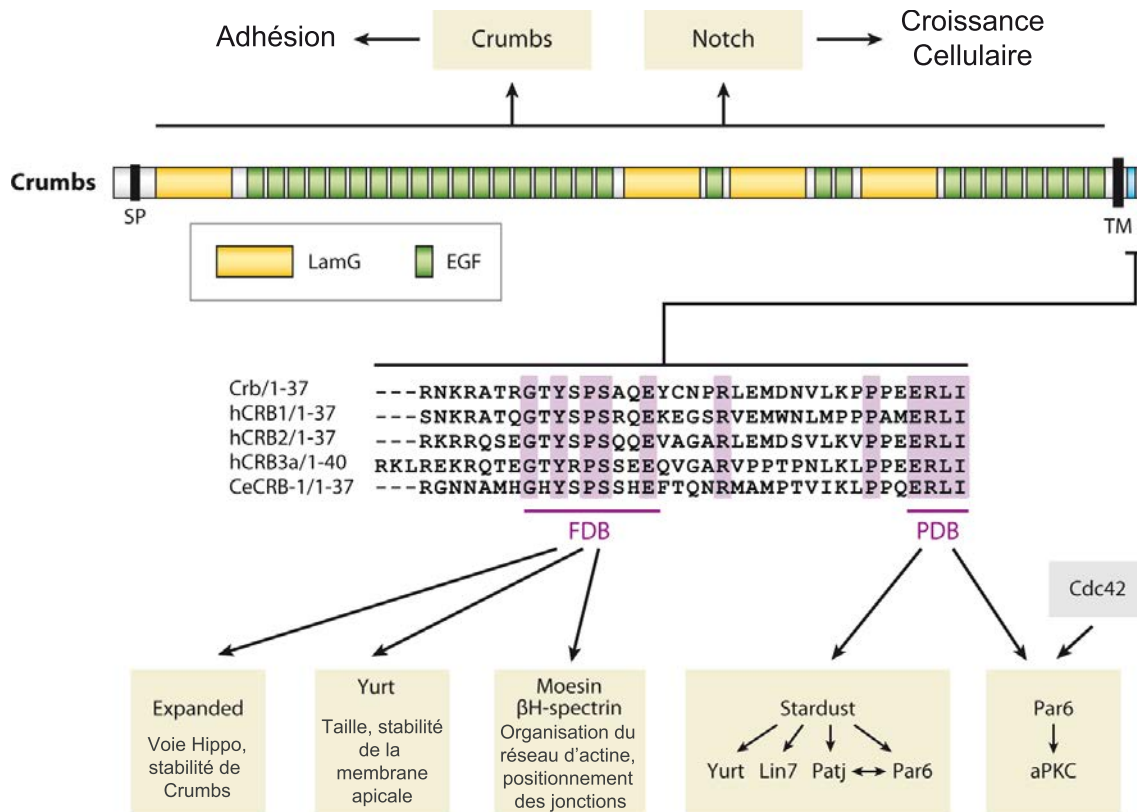


FIGURE 19 – La protéine Crumbs et ses interacteurs, adapté de [Tepass, 2012] et de [Bulgakova and Knust, 2009]

Le domaine extracellulaire de Crumbs interagit avec Notch, et limite la croissance cellulaire médiée par Notch. En établissant des liaisons homophiliques, Crumbs se comporte comme une protéine d'adhésion. La région intracellulaire possède deux domaines conservés, FDB : domaine de liaison aux FERM et PDB : site de liaison aux domaines PDZ. Les protéines interagissant avec Crumbs sont impliquées dans différents processus. Abréviations : EGF, epidermal growth factor ; LamG, laminin G domain ; PIP2, Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate ; SP, signal peptide ; TM, transmembrane domain.

Crumbs est une molécule d'adhésion

Le domaine extra-cellulaire de Crumbs peut former des liaisons homophiliques, et jouer le rôle de molécule d'adhésion. En effet, une interaction directe entre les domaines extra-cellulaires fut montrée chez les vertébrés, et l'expression de Crumbs dans des cellules Humaines est suffisante à la formation d'agrégats. Ce phénotype est dépendant de son domaine extra-cellulaire, prouvant que Crumbs est une molécule d'adhésion [Zou et al., 2012].

Chez la drosophile, la formation des trachées commence par l'invagination de placodes, groupe de cellules au sein de l'épithélium embryonnaire. Avant leur invagination, les placodes présentent un niveau élevé de Crumbs, et les cellules situées à la périphérie de la placode montrent une forte anisotropie de la localisation de Crumbs. En effet, Crumbs

est déplétée de la jonction en contact avec l'extérieur de la placode [Röper, 2012]. Cette distribution est typique des protéines d'adhésion, recrutées préférentiellement aux points où elles peuvent établir de nombreuses interactions homophiliques, ici vers le centre de la placode. Enfin, dans l'épithélium folliculaire, la stabilité de Crumbs au pôle apical dépend des liaisons homophiliques de Crumbs. En effet, la présence de protéines Crumbs sauvage est suffisante au maintien de la version non phosphorylable de Crumbs à la membrane, alors qu'en l'absence de Crumbs sauvage, la version mutée s'accumule dans des vésicules [Fletcher et al., 2012].

Crumbs est impliquée dans la régulation du réseau d'acto-myosine

L'anisotropie de Crumbs à la périphérie des placodes est impliquée dans la formation d'un câble d'actine et de myosine. En effet, l'anisotropie de Crumbs est associée à une anisotropie d'aPKC (et de manière surprenante, pas de Par-6). Or aPKC phosphoryle et inhibe Rok, activateur de la myosine [Röper, 2012]. Ainsi, la formation du câble d'acto-myosine autour de la placode serait due à l'exclusion de Rok des jonctions riches en Crumbs et aPKC, et à son accumulation au niveau des jonctions à la périphérie de la placode.

Le domaine de liaison aux FERM de Crumbs recrute Moesin et la β_{Heavy} Spectrine [Médina et al., 2002], et participe donc à l'organisation du réseau apical de Spectrine. Moesin organise le cortex des cellules en liant les phospholipides au réseau d'actine cortical. Dans les épithéliums, Moesin est recrutée par Crumbs au domaine apical, et les homologues de Moesin chez les mammifères sont requis pour l'établissement de la polarité épithéliale (Pour revue [McClatchey, 2014]). En recrutant Moesin, Crumbs est certainement responsable d'une partie de l'organisation du cortex et du réseau d'acto-myosine cortical.

Crumbs est un régulateur des voies de signalisations Hippo et Notch

Le complexe Expanded-Kibra-Merlin est un régulateur de la voie Hippo et promeut la phosphorylation de Wts. Puisque toute altération de Crumbs affecte la localisation de ce complexe, la voie Hippo est aussi affectée. Le modèle proposé aujourd'hui veut que Crumbs recrute la protéine Hippo au pôle apical par l'intermédiaire des protéines FERM Expanded, Kibra et Merlin. Cette localisation apicale permettrait l'activation de Hippo par des mécanismes encore inconnus [Robinson et al., 2010] [Yu et al., 2010] [Grzeschik et al., 2010] [Ling et al., 2010].

Différentes études ont également identifié Crumbs comme régulateur négatif de la voie Notch, et cette régulation dépend de la présence de Delta, le ligand du récepteur Notch [Herranz et al., 2006], [Richardson and Pichaud, 2010]. Chez le poisson zèbre,

une interaction entre les domaines extracellulaires de Crumbs et de Notch a été identifiée [Ohata et al., 2011], soulevant l’hypothèse que Crumbs inhibe l’activation de Notch inhibant son association avec le ligand Delta.

2.5 Polarité planaire

Nous venons de décrire en détail l’organisation de la polarité apico-basale des épithéliums et sa régulation par les protéines PAR. Il existe au sein de nombreux épithéliums, un autre type de polarité, appelé polarité planaire, c’est à dire une polarité dans le plan du tissu, perpendiculaire à la polarité apico-basale. Nous décrirons ici deux types de polarité planaires, celle régulée par la voie de signalisation PCP, ainsi que celle établie dans le neur ectoderme lors de l’extension de la bande germinale.

2.5.1 La voie PCP (*Planar Cell Polarity*)

La voie de signalisation PCP contrôle la polarité planaire dans de nombreux tissus et les gènes de la voie sont conservés chez les Vertébrés. Un groupe de protéines est retrouvé dans tous les tissus orientés par la PCP. Il s’agit de six protéines transmembranaires et cytoplasmiques se localisant près des AJ. Ces protéines s’organisent en deux domaines complémentaires, établissant un axe de polarité dans la cellule (Fig 20). Ainsi, Frizzled(Fz), Dishevelled(Dsh) et Diego(Dgo) se localisent à un pôle de la cellule, alors que Van Gogh(Vang) et Prickle(Pk) se localisent au pôle opposé. Seule Flamingo(Fmi) est recrutée au deux pôles.

L’effet de *dsh*, *pk*, *fmi* et *dgo* est autonome cellulaire, alors que l’inhibition de *fz* ou de *Vang* affecte aussi la polarisation des cellules voisines. Fz et Vang sont des protéines transmembranaires dont les domaines extracellulaires interagissent [Wu and Mlodzik, 2008]. Puisque l’effet non autonome cellulaire de Fz dépend de la présence de Vang dans le tissu, il est vraisemblable que l’interaction Fz-Vang soit responsable de la transmission de l’information de polarité entre les cellules voisines. En revanche, la présence de Fmi est aussi indispensable à l’effet non autonome cellulaire de Fz. Fmi est également une protéine transmembranaire, mais contrairement à Fz et Vang, son domaine extracellulaire n’établit que des interactions homophiliques [Usui et al., 1999].

L’actuel modèle de polarisation planaire par la PCP est que Fmi stabilise Vang et Fz, et favorise l’interaction de leurs domaines extracellulaires. Ce modèle est soutenu par les interactions directes Fmi-Fz chez la Drosophile [Chen et al., 2008] , et Fmi-Vang chez les mammifères [Devenport and Fuchs, 2008]. La localisation asymétrique de ces protéines

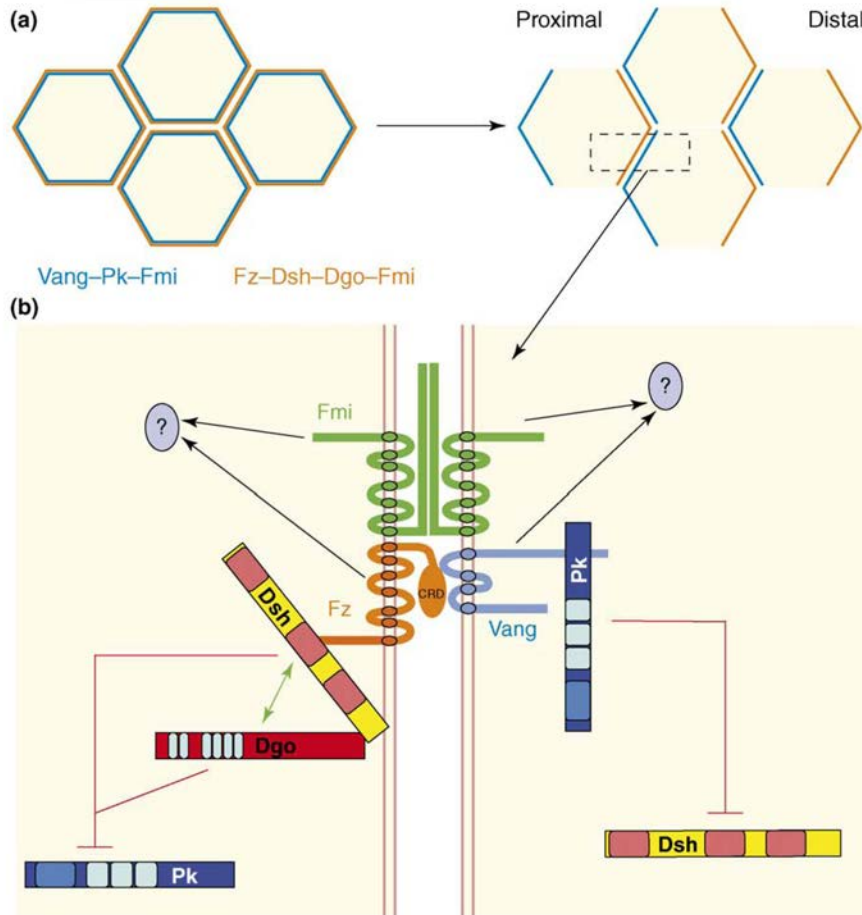


FIGURE 20 – Localisation asymétrique des protéines de la PCP, adapté de [Wu and Mlodzik, 2009]

A Cellules de l'épithélium des ailes de *Drosophila* vues du dessus. Au début du développement pupal (à gauche), les protéines sont toutes distribuées de manière symétriques. Plus loin dans le développement (à droite), un complexe Fz-Dsh-Dgo-Fmi se concentre au pôle distal, alors qu'un complexe Vang-Pk-Fmi se localise au pôle proximal.

B Représentation schématique des interactions entre les protéines de la PCP. Fmi est une protéine transmembranaire, donc le domaine extracellulaire établit des liaisons homophiliques. Fz et Vang sont aussi des protéines transmembranaires, et leurs domaines extracellulaires peuvent se lier l'un à l'autre. Dsh est recruté par Fz, et interagit avec Dgo, alors que Pk est recruté par Vang. Dsh et Dgo antagonisent Pk, et Pk antagonise Dsh.

transmet une information de polarisation à la cellule. Cependant, les signaux intracellulaires en aval des protéines de la PCP sont aujourd'hui encore totalement inconnus.

En amont de cette organisation intra-cellulaire, une signalisation plus globale doit exister pour aligner la polarité planaire selon les axes du plan d'organisation de l'animal. Fat(Ft) et Dachsous(Ds) sont des Cadhérines atypiques exprimées en gradients opposés dans l'aile de *Drosophile*, et l'inversion de ces gradients est suffisante pour renverser l'orientation des protéines de la PCP dans les cellules de l'aile [Matakatsu and Blair, 2004] [Simon, 2004]. Cette étude fait de la signalisation Fat/Dachsous un bon candidat pour le contrôle de l'orientation globale de la PCP. Cependant les gradients Fat/Dachsous observés ne sont pas toujours orientés de la même façon par rapport aux protéines de la PCP. Ainsi, dans l'aile de *Drosophile* une forte activation de Fat à l'extrémité distale corréle avec la localisation de Fz au pôle proximal des cellules, alors que la corrélation inverse est observée dans l'oeil de *Drosophile*. Ainsi, l'orientation des protéines de la PCP le long des axes du plan d'organisation de l'animal sont encore mal compris [Wu and Mlodzik, 2009].

2.5.2 Un autre type de polarité planaire : l'extension de la bande germinale

Au cours de la gastrulation de l'embryon de *Drosophile*, l'ectoderme s'allonge sur l'axe antéro-postérieur, allant jusqu'à doubler sa taille initiale (Fig 21 A). Les changements de forme des cellules ou les divisions orientées sur l'axe antéro-postérieur ne sont pas requis. En revanche, le réarrangement des cellules les unes par rapport aux autres est nécessaire pour la réorganisation. Deux mécanismes de réarrangements ont été décrits : la formation de rosettes et l'intercalation de cellules (Fig 21 CC').

Dans les deux cas, ces réarrangements sont possibles grâce à la contraction des jonctions à la frontière des pôle antérieurs et postérieurs (jonctions AP). Cette contraction polarisée est due à la présence d'une polarité planaire très prononcée dans les cellules de l'ectoderme. En effet, un enrichissement en F-actin, MyoII, Rok et RhoGEF2 est visible le long des jonctions AP, alors qu'un enrichissement de E-Cad, β -caténine et Baz est observé le long des jonctions opposées, les jonctions dorso-ventrale (DV) [Zallen and Wieschaus, 2004], [Blankenship et al., 2006] [Simões et al., 2010] (Fig 21B).

Mise en place de la polarité planaire

Cette polarité planaire n'est pas dépendante de la voie de signalisation PCP. En effet, les mutants *fz* ou *dsh* ne présentent pas de problème d'extension de la bande germinale,

et la polarité planaire décrite plus haut ne semble pas non plus être affectée [Zallen and Wieschaus, 2004]. Cette observation est néanmoins à modérer puisque pour étudier l'effet de la déplétion de Dsh sur la polarité planaire des cellules de l'ectoderme, les auteurs n'ont regardé qu'un marqueur de la polarité planaire, l'expression ectopique de la protéine Slam, qui se localise aux jonctions AP. Si la localisation de Slam n'est pas affectée par la déplétion de Dsh, nous ne pouvons exclure qu'il existe des défauts de polarisation des autres protéines. En revanche, les gènes de segmentation de l'embryon sur l'axe antéro-postérieur sont requis pour la polarité planaire. En effet, lorsque la spécification de l'axe dorso-ventral est abolie, l'intercalation des cellules n'est pas affectée. En revanche, les mutants pour les gènes *pair-rule* définissant l'axe antero-postérieur, et plus particulièrement *eve* et *runt* affectent la polarité planaire et l'intercalation. De plus, l'expression ectopique d'un de ces deux gènes induit une asymétrie de Slam dans l'embryon. Ainsi, Eve et Runt sont à la fois requis et suffisant pour l'apparition de la polarité planaire dans les cellules de l'ectoderme [Zallen and Wieschaus, 2004].

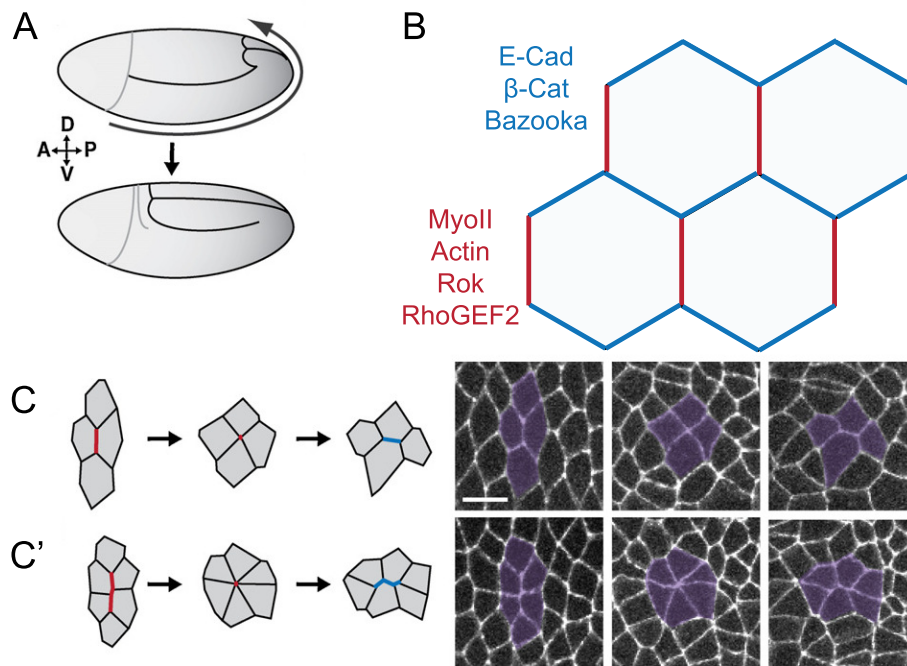


FIGURE 21 – Polarité planaire pendant l'extension de la bande germinale, adapté de [Vichas and Zallen, 2011]

- A Extension de la bande germinale.
- B Organisation de la polarité planaire du tissu
- C Réarrangement des cellules par intercalation.
- C' Réarrangement des cellules par formation de rosettes.

Rôle de la PCP

L'analyse menée en 2004 sur le rôle de la PCP dans la polarité planaire des cellules de l'ectoderme n'a étudié que l'asymétrie du marqueur Slam. Une étude plus récente sur le rôle de la PCP nuance leurs résultats. Ainsi, la polarisation de RhoGEF2, E-Cad, myoII et Baz est perdue dans les mutants *fz*. De façon surprenante, la polarisation de β -cat est maintenue. De plus un enrichissement de Fz aux jonctions AP est observé, et une interaction entre Dsh et RhoGEF2 est mise en évidence par co-immunoprécipitation. Ainsi, RhoGEF2 serait recrutée aux jonctions AP par Dsh [Warrington et al., 2013]. Cependant, au niveau cellulaire, l'analyse de la localisation de Fz n'est pas étudiée, nous ne savons donc pas si Fz est uniquement enrichie au pôle postérieur des cellules, ou si Fz est complètement bipolaire. Ainsi, si comme dans une grande majorité de tissus, Fz est uniquement enrichie au pôle postérieur, le recrutement de RhoGEF2 au pôle antérieur devient plus compliqué à expliquer.

Asymétrie de Baz

La polarisation de Baz est dépendante de l'asymétrie de Rok. En effet, la déplétion de Rok conduit à la perte de la polarisation de Baz, et son activation constitutive exclut Baz du cortex. En effet, Rok phosphoryle Baz sur sa région C-Terminale, et cette phosphorylation inhibe la localisation de Baz à la membrane. Si cette phosphorylation inhibe la liaison Baz- β -cat et/ou Baz-Ed reste encore à étudier. Ainsi, la localisation asymétrique de Rok aux jonctions AP permet l'exclusion de Baz de ces jonctions, et donc son enrichissement aux jonctions DV [Simões et al., 2010].

Dynamique de l'endocytose de E-Cad

Comme nous l'avons déjà évoqué, la dynamique de l'endocytose de E-Cad aux jonctions est essentielle à la plasticité des épithéliums. Au cours de l'extension de la bande germinale, le réarrangement des cellules les unes par rapport aux autres sous-entend que leurs jonctions sont particulièrement plastiques. L'étude de l'endocytose d'E-Cad dans ce tissu a montré qu'elle s'effectuait préférentiellement depuis les jonctions AP. C'est d'ailleurs cette endocytose polarisée qui est à l'origine de l'asymétrie de E-Cad dans ces cellules. En effet l'inhibition de l'endocytose de E-Cad empêche sa polarisation [Levayer et al., 2011]. Cette étude montre également que c'est l'enrichissement de RhoGEF2 aux jonctions AP qui, en activant Diaphanous et MyoII, est responsable de l'endocytose.

Ainsi, Le recrutement via Fz/Dsh aux jonctions AP de RhoGEF2 induit l'endocytose de E-Cad, et par conséquent son enrichissement aux jonctions DV. Lors de l'analyse par FRAP (Recouvrement de Fluorescence Après Photoblanchiment) de E-Cad aux jonctions

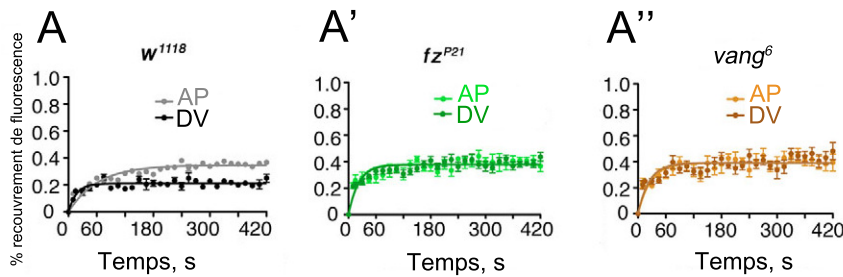
AP et DV, les fractions mobiles et immobiles de E-Cad ont été déterminées (Fig 47 A). La fraction mobile de E-Cad est plus grande dans les jonctions AP que dans les jonctions DV, sous entendant que l'endocytose d'E-Cad provoque une augmentation de la mobilité de la protéine [Warrington et al., 2013]. La différence de recouvrement de fluorescence entre les deux types de jonctions est d'ailleurs abolie dans les mutants PCP, allant dans le sens du modèle (Fig 47 A'A'').

Les analyses par FRAP (Recouvrement de Fluorescence Après Photoblanchiment) normalisent les données d'intensité, donnant un résultat en pourcentage de la quantité de départ. Une étude récente analyse le recouvrement après photobleaching de E-Cad aux jonctions AP et DV de l'embryon, mais en tenant compte de l'intensité de départ des jonctions [Bulgakova et al., 2013]. Les auteurs comparent ainsi les quantités absolues de protéines dans les fractions mobiles et immobiles aux jonctions. Nous noterons cependant que cette étude à été menée sur des embryons de stade 15, qui ont déjà accompli l'allongement de leur bande germinale, mais dont les cellules possèdent toujours la polarisation planaire caractéristique.

La régulation de la polarité planaire au stade 15 doit être au moins partiellement différente de celle observée plus tôt, car la simple étude par FRAP de E-Cad aux jonctions AP et DV montre un résultat opposé. En effet, à ce stade, les jonctions DV présentent une fraction mobile plus grande que les jonctions AP (Fig 47 B). Cette étude montre que la différence d'intensité de E-Cad observée entre les jonctions DV et AP est due à la présence d'une grande quantité de E-Cad mobile aux jonctions DV, alors que la quantité immobile dans les deux types de jonctions semble similaire (Fig 47 B'). Puisque cette quantité mobile est dépendante de la présence de Baz dans le système, les auteurs émettent l'hypothèse que la fraction mobile de E-Cad représente celle qui est en complexe avec Baz. En effet, l'inhibition de Baz dans ce système provoque une grande diminution de la fraction mobile de E-Cad aux jonctions DV et AP, mais laisse intacte la quantité de E-Cad immobile aux jonctions (Fig 47 C-C''). Cette étude démontre également une orientation d'un réseau de microtubules (MT) apical le long de l'axe DV, et propose que l'extrémité de ces MT inhibe RhoGEF2. Ce modèle explique l'enrichissement de RhoGEF2 aux jonctions AP, où il inhiberait la mobilité de E-Cad.

Les analyses de l'impact de l'endocytose de E-Cad sur la mobilité de la protéine aux stades 8 et 15, sont contradictoires. Analyser les quantités absolues de E-Cad mobiles et immobiles pendant le stade 8 de l'embryogénèse pourrait clarifier le rôle de RhoGEF2 dans la dynamique des jonctions, et confirmer la présence de mécanismes différents entre ces deux stades du développement embryonnaire.

Mobilité d'E-Cad aux jonctions au stade 8:



Mobilité d'E-Cad aux jonctions au stade 15:

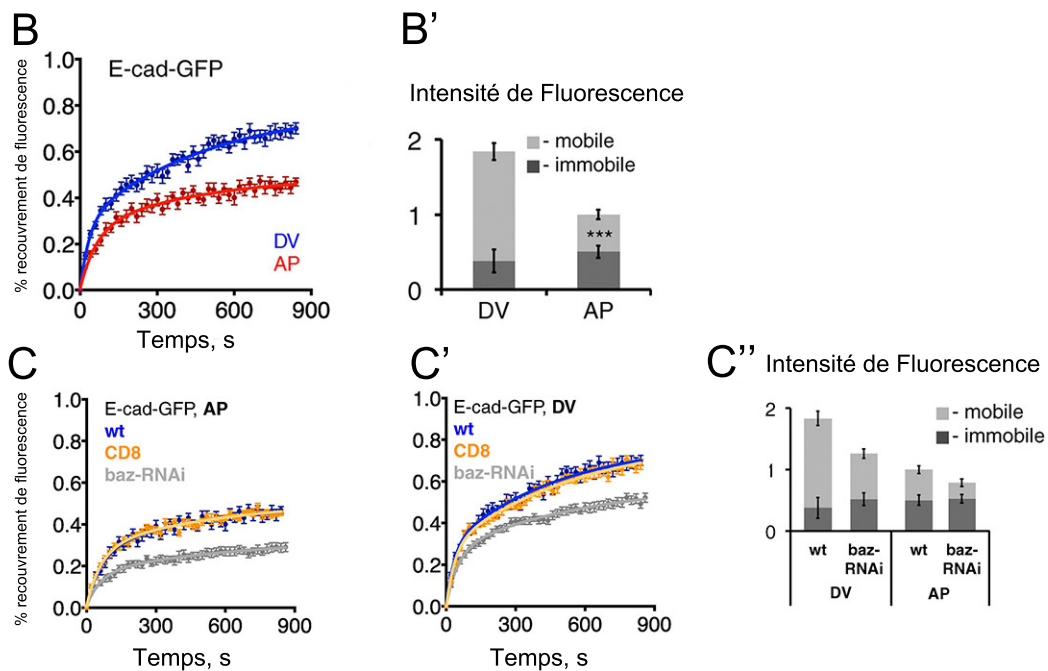


FIGURE 22 – Etude par FRAP de la mobilité de Cadherine aux jonctions, adapté de [Warrington et al., 2013] et [Bulgakova et al., 2013]

A-A'' Recouvrement après photobleaching de E-Cad aux jonctions AP et DV, dans un contexte sauvage (A), mutant pour *fz* (A') et mutant pour *vang* (A''). La fraction mobile est plus grande dans les jonctions AP que dans les DV chez le sauvage, et cette différence est abolie dans les contextes mutants pour la PCP.

B-B' Recouvrement après photobleaching de E-Cad aux jonctions AP et DV, dans un contexte sauvage. La fraction mobile est plus grande sur les jonctions DV que sur les jonctions AP (B). En revanche, la fraction immobile est comparable (B') **C-C'** Recouvrement après photobleaching de E-Cad aux jonctions AP et DV, dans un contexte sauvage et déplétée en Baz (ARN interférence contre Baz). Sur les deux types de jonctions, la mobilité de E-Cad diminue lorsque la quantité de Baz diminue (C et C'). En revanche, la fraction immobile de E-Cad est comparable entre les deux types de jonctions (C'').

2.6 Conclusions sur la polarité épithéliale

Nous avons décrit les régulateurs majeurs de la polarité épithéliale : Les protéines PAR, associées à d'autres protéines de polarité telles que Crumbs. Les jonctions adhérentes, et les mécanismes d'adhésion en général font intégralement parti de ce système. Ainsi, en plus d'être un régulateur de l'organisation des protéines PAR, Crumbs est une molécule d'adhésion. De même les protéines de la voie PCP Fz, Vang et Fmi établissent des connexions entre les cellules. Il existe donc un groupe de protéines associées à la fois au contrôle de la polarité, et au contrôle de l'adhésion. Ces deux notions sont rarement associées dans l'étude de la polarité des épithéliums matures. De plus, l'étude de la régulation de la polarité épithéliale par les mécanismes d'adhésion est difficile car les mutations des gènes des protéines d'adhésion provoquent une grande désorganisation de l'épithélium. L'étude de la régulation des protéines PAR par les protéines d'adhésion, et par la tension aux jonctions, sera vraisemblablement source de nombreuses avancées dans la compréhension de la polarité épithéliale.

Chapitre 3

La division asymétrique de la SOP.

Au cours de ma Thèse, je me suis intéressée à la division asymétrique d’une cellule épithéliale : le précurseur des organes sensoriels externes de la *Drosophile*. Dans ce chapitre, je reviens sur les différentes études décrivant sa division.

3.1 Le lignage de la SOP.

Un modèle bien connu de division asymétrique est le lignage des organes sensoriels externes de la *Drosophile* [Gho et al., 1999]. Les organes sensoriels externes recouvrent le corps de la mouche adulte (Fig 23A). Chaque organe est composé de quatre cellules distinctes : deux cellules externes (soie et socle) et deux cellules internes (neurone et gaine)(Fig 23B). Ces quatre cellules dérivent d’une cellule SOP (Sensory Organ Precursor). Chaque SOP est spécifiée au sein d’un épithélium, à partir d’un groupe de cellules épithéliales équipotentes appelé PNC (ProNeural Cluster)(Fig 23C).

Les cellules du PNC expriment les facteurs proneuraux Achaete et Scute qui codent des activateurs de transcription de type bHLH, et qui confèrent à ces cellules le potentiel pour devenir SOP. La sélection de la SOP parmi les cellules du PNC se fait par un mécanisme d’inhibition latérale, impliquant la voie de signalisation Notch, et visant à affiner l’expression d’Achaete et Scute à la future cellule précurseur [Cubas et al., 1991], [Heitzler and Simpson, 1991].

Le récepteur Notch et son ligand Delta sont des protéines transmembranaires qui interagissent par leur domaines extracellulaires. Dans la cellule réceptrice, cette interaction induit la translocation dans le noyau du domaine intracellulaire de Notch (N^{intra}). Les gènes cibles de la voie sont réprimés par un complexe Su(H)-coR (Suppressor of Hairless, facteur de transcription de la famille des CSL (CBF1, Su(H), LAG-1), associé à des co-répresseurs). Dans le noyau, N^{intra} se lie à Su(H) et forme un complexe activateur de

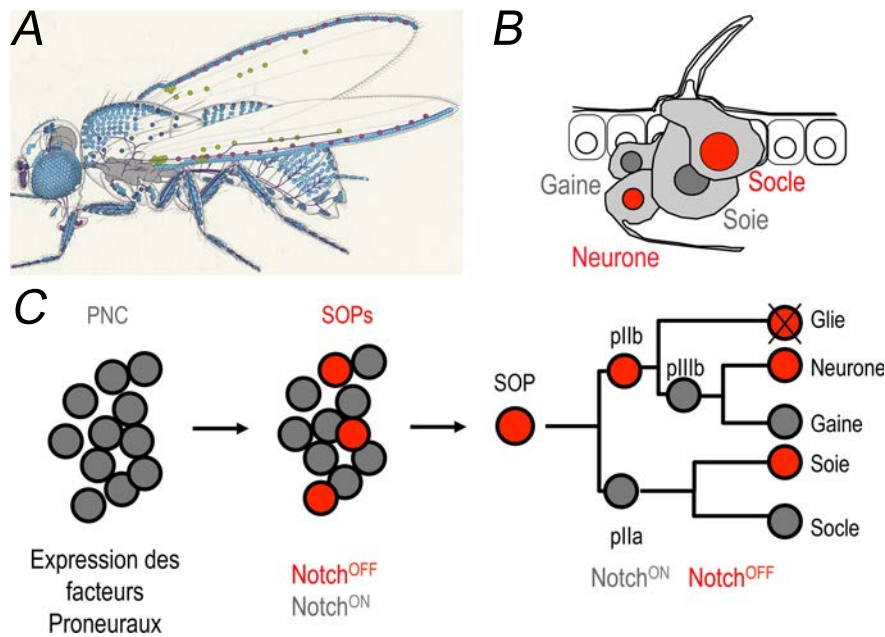


FIGURE 23 – Le lignage de la SOP

A. Répartition des organes sensoriels externes sur le corps de la *Drosophile* adulte.

B. Les quatre cellules de l'organe sensoriel externe. Les cellules dites externes : la socle et la soie. Les cellules dites internes : la gaine et le neurone.

C. Le lignage des organes sensoriels externes. Les SOPs sont spécifiées au sein d'un épithélium, dans un cluster de cellules appelé cluster proneural (PNC pour ProNeural Cluster). Suite à l'inhibition latérale, les SOPs sont spécifiées et inactivent la voie Notch, alors que dans les cellules restantes, la voie Notch reste activée. La SOP entre ensuite dans une série de divisions asymétriques, chacune générant une cellule fille où la voie de signalisation Notch est activée, et une cellule où la voie n'est pas activée.

la transcription des gènes cibles (Fig 24) (pour revues [Bray, 2006], [Kopan and Ilagan, 2009]).

Initialement, toutes les cellules du PNC expriment Notch et Delta, et signalent entre-elles. La sélection de la SOP semble reposer sur l'amplification de différences dans la signalisation Delta/Notch entre la future cellule précurseur et les autres cellules. Ce mécanisme est appelé inhibition latérale (Fig 25A). Ainsi, la future SOP présente une faible activation de la voie Notch, pendant que les autres cellules du PNC expriment fortement les gènes cibles de la voie : les gènes du complexe Enhancer of Split (E(spl)-C). Trois mécanismes de retrocontrôle négatif ont été proposés. Une boucle de régulation reposant sur la transcription du gène Delta (Fig 25B) [Heitzler et al., 1996], la cis-inhibition de Notch par Delta (Fig 25B) [Sprinzak et al., 2010], ainsi que l'inhibition de l'activation de Delta par des gènes de E(spl)-C : les gènes Bearded (Fig 25C) [Chanet et al., 2009]. Les cellules non sélectionnées du PNC donneront les cellules de l'épiderme. Les SOPs se diviseront de manière asymétrique selon un lignage stéréotypé pour produire les différentes cellules

qui composent un organe sensoriel externe. A chaque division, le destin des cellules filles dépend de l'activation différentielle de la voie Notch (Fig 23C).

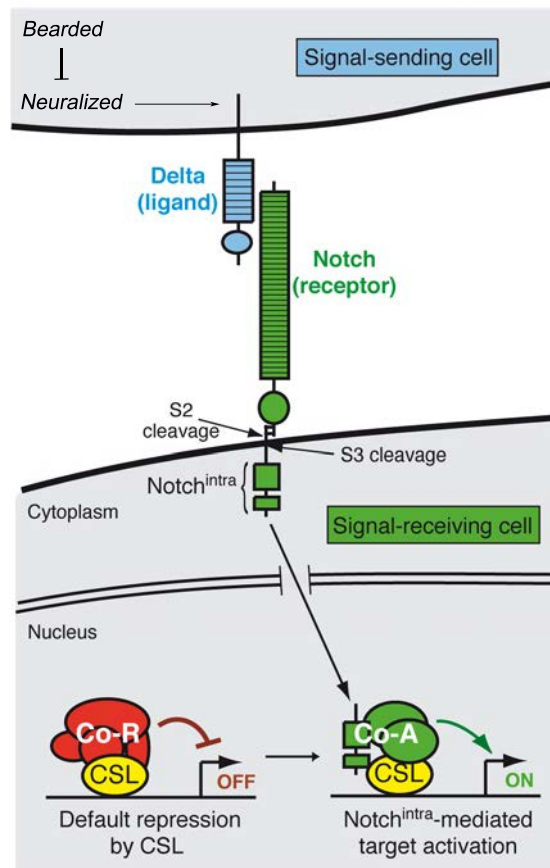
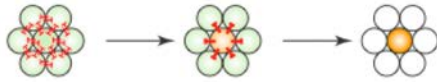


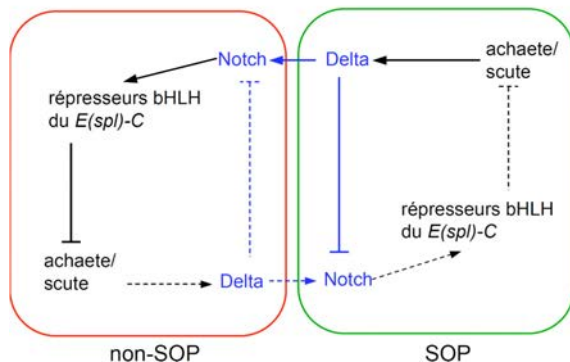
FIGURE 24 – La voie de signalisation Notch, adapté de [Lai, 2004]

La fixation du ligand Delta au récepteur Notch entraîne le clivage de ce dernier aux sites S2 et S3. Les metalloprotéases de la famille ADAM clivent Notch au site S2, puis la γ -Secretase le clive au site S3, libérant la partie intracellulaire (NICD) qui est transloquée dans le noyau. NICD active alors la protéine se liant à l'ADN CSL (CBF1, Su(H), LAG-1). En effet, la liaison de NICD à CSL participe à la formation d'un complexe activateur (CSL/A) qui active la transcription des cibles de la voie Notch. En absence de signal les cibles transcriptionnelles de Notch sont réprimées par le complexe répresseur CSL/R. L'Ubiquitination de Delta par Neuralized suivie de l'endocytose du ligand est nécessaire à son activation. Les protéines Bearded sont des inhibiteurs de Neuralized.

A. Inhibition latérale



B. Modèle de rétrocontrôle négatif 1



C. Modèle de rétrocontrôle négatif 2

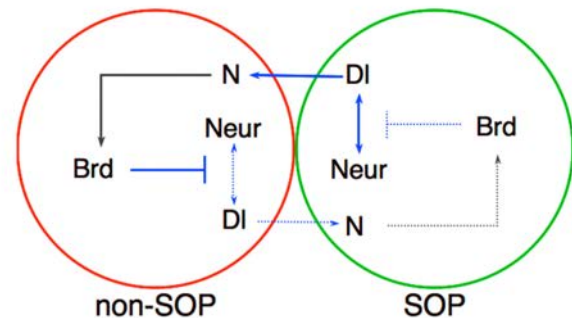


FIGURE 25 – Inhibition latérale

A Inhibition latérale : Restriction de l'adoption du destin de précurseur neural à une cellule unique au sein d'un cluster proneural. Initialement, les cellules du cluster proneural (vert) s'inhibent mutuellement, chacune envoyant et recevant le signal Delta. Le signal devient directionnel, une cellule est sélectionnée (orange) et inhibe les cellules voisines, les empêchant d'adopter le même destin qu'elle. Les cellules précurseurs des soies sensorielles (SOP) sont ainsi sélectionnées.

B Modèle de rétrocontrôle négatif 1 :

Rétrocontrôle transcriptionnel : L'activation du récepteur Notch dans la cellule non-SOP conduit à l'inhibition de la transcription du ligand Delta. Les répresseurs de transcription de type bHLH codés par le complexe *Enhancer of split* (*E(spl)*) sont des cibles de Notch. Ils inhibent la transcription de Delta [Heitzler et al., 1996].

La cis-inhibition du récepteur Notch par son ligand Delta pourrait également contribuer à réduire l'activité du récepteur dans la cellule non-SOP [Sprinzak et al., 2010].

C Modèle de rétrocontrôle négatif 2 :

L'inhibition de l'interaction Neur-Delta par les protéines de la famille Brd fait partie de la boucle de rétrocontrôle. L'activation de Notch dans la cellule non-SOP conduit à l'activation transcriptionnelle des gènes *Brd*. Les protéines Brd inhibent l'activité de Neur, et par conséquent l'activité du ligand Delta. [Chanet et al., 2009]

Les étapes faisant intervenir une régulation transcriptionnelle sont en noir et celles faisant intervenir une régulation post-transcriptionnelle sont en bleu.

3.2 Description générale de la division asymétrique.

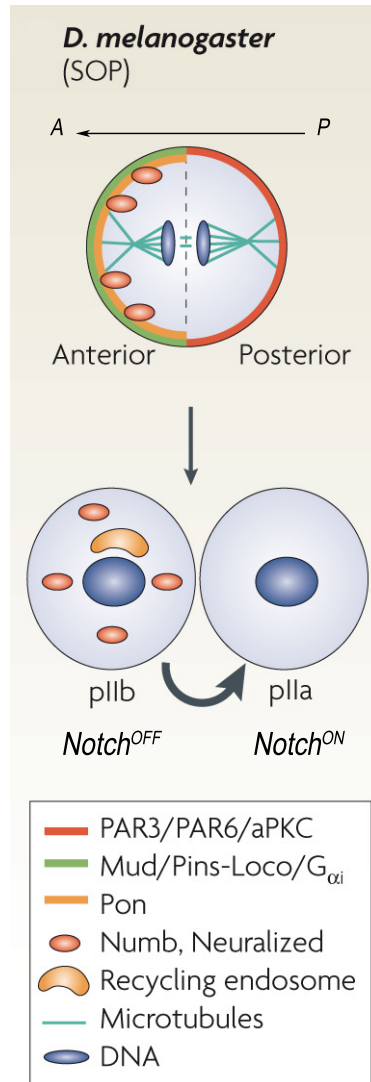


FIGURE 26 – Division asymétrique de la SOP, adapté de [Gönczy, 2008]

La division de la SOP se fait le long de l'axe antéro-postérieur. Sont représenté sur ce schéma les deux domaines du cortex : le complexe PAR au pôle postérieur, Pon, ainsi que le complexe Mud/Pins/G_{αi} au pôle antérieur. Les déterminants cellulaires Numb et Neuralized sont localisés au pôle antérieur, et le fuseau mitotique s'aligne le long de l'axe antéro-postérieur. La distribution asymétrique des déterminants cellulaires conduit à la spécification d'une cellule pIIb ou la voie de signalisation Notch est inactivée, et une cellule pIIa ou la voie Notch est activée.

La SOP (ou pI) se divise pour donner deux cellules filles : une cellule antérieure pIIb ou la voie de signalisation Notch est inactivée, et une cellule postérieure pIIa ou la voie de signalisation Notch est activée. Cette différence d'activation du récepteur Notch dans les deux cellules filles est due à la ségrégation asymétrique des protéines Numb et Neuralized lors de la division [Rhyu et al., 1994] [Le Borgne and Schweisguth, 2003]. Numb est une protéine inhibitrice de la voie de signalisation Notch et Neuralized est impliquée dans l'activation du récepteur Delta [Lai et al., 2001] [Pavlopoulos et al., 2001] [Yeh et al., 2001]. Pendant la division, ces protéines se localisent au cortex antérieur de la cellule. Elles seront ensuite distribuées uniquement dans la pIIb, grâce à l'alignement du fuseau mitotique perpendiculairement au pôle antérieur .

Tout comme les divisions des neuroblastes de *D. melanogaster* ou du zygote de *C. elegans*, la division de la SOP requiert la distribution asymétrique du complexe PAR. Ici, Baz,

Par-6 et aPKC s'accumulent au pôle postérieur de la SOP d'où elles excluent Numb et Neuralized, vers le pôle antérieur. [Wirtz-Peitz et al., 2008] Au cours des quinze dernières années, de nombreuses études se sont focalisées sur les mécanismes sous-tendant la mise en place d'une telle asymétrie (Fig 26).

3.3 Etablissement de l'axe de polarité.

Au cours de la division, le cortex de la SOP s'organise en 2 domaines principaux. Un domaine postérieur où se localise le complexe PAR (Baz, Par-6 et aPKC), et un domaine antérieur regroupant les protéines Pins, Gai et Dlg [Bellaïche et al., 2001].

3.3.1 Rôle de la PCP.

Très tôt, la PCP a été impliquée dans l'orientation de la division de la SOP. Dans les clones mutants *fz*, la division se fait toujours dans le plan de l'épithélium, mais son orientation est aléatoire et non plus alignée selon l'axe antéro-postérieur [Gho and Schweisguth, 1998]. Les protéines de la voie PCP Fz et Vang sont enrichies respectivement au pôle postérieur et antérieur apicaux de la SOP en prophase, et Vang forme un croissant au cortex antérieur pendant la division [Bellaïche et al., 2004]. (Fig 27 et Fig 28).

Cependant, l'asymétrie de la SOP est peu affectée par l'absence de la voie PCP. Baz est asymétrique dans les clones mutants *fz*, tout comme Pins-Gai, même si le croissant du complexe antérieur est plus étendu que chez le sauvage. [Bellaïche et al., 2001] [Schaefer et al., 2001]. Des résultats similaires sont obtenus pour les mutants *dsh* [Gomes et al., 2009]. Dans les clones mutants *Vang* et *pk*, une différence peut être relevée : le recrutement de Pins au pôle antérieur est retardé. Toujours dans les clones mutants *Vang* et *pk*, l'asymétrie du complexe PAR n'a pas été testée, mais la formation d'un croissant antérieur de Numb laisse penser que le complexe PAR est asymétrique [Bellaïche et al., 2004].

Ainsi, la voie de signalisation PCP est requise pour l'orientation de la division selon l'axe antéro-postérieur, mais pas nécessaire à l'établissement de la polarité de la SOP.

3.3.2 Influence réciproque des domaines antérieurs et postérieurs.

Dans la division du zygote de *C.elegans* les domaines antérieur et postérieur s'excluent mutuellement. Un mécanisme similaire a-t-il lieu dans la SOP ? Puisque dans les mutants *baz* l'asymétrie de Pins-Gai n'est pas affectée [Bellaïche et al., 2001], l'asymétrie de Baz n'est pas nécessaire à l'asymétrie du complexe antérieur. L'inverse n'est pas forcément

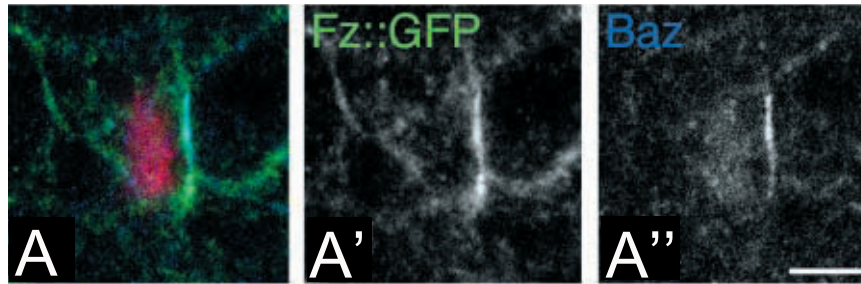


FIGURE 27 – Fz-GFP est enrichie au pôle apical postérieur des SOPs en prophase, adapté de [Bellaïche et al., 2004].

Fz-GFP (anti-GFP dans **A-A'**) co-localise avec Baz (bleu dans **A,A''**) au cortex postérieur des SOP en début de prophase. Ici, Senseless (rouge en **A**) est utilisée comme marqueur de SOP

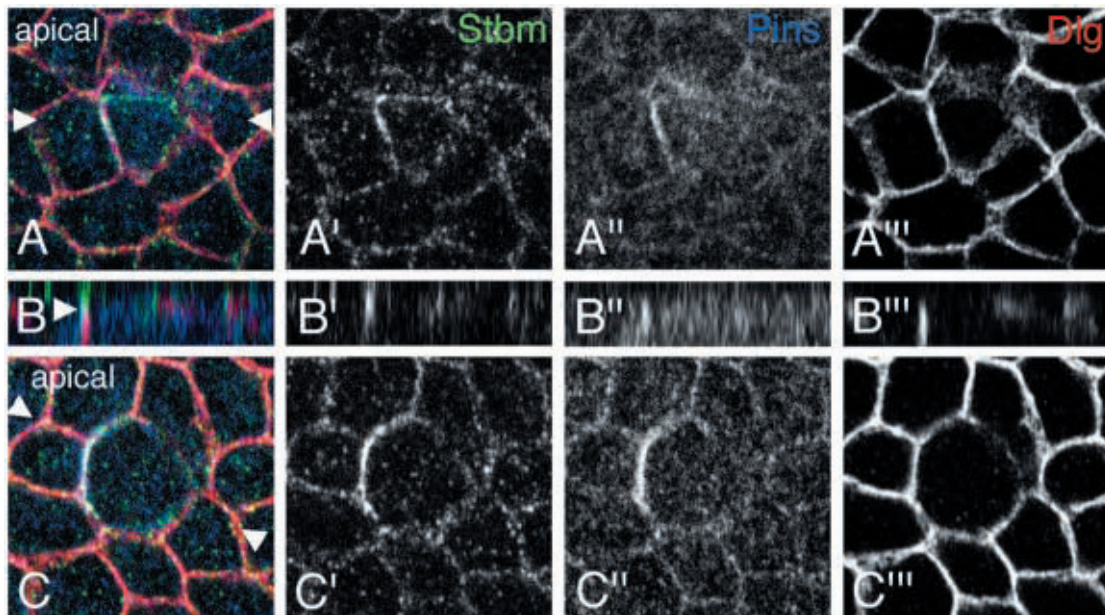


FIGURE 28 – Vang est enrichie au pôle apical antérieur des SOPs en prophase. Adapté de [Bellaïche et al., 2004]

A-B''' Localisation de Vang (vert), Pins (bleue) et Dlg (rouge) dans la SOP en division. En prophase, Vang (**A',B'**) colocalise avec Pins (**A'',B''**) au cortex antérieur. Dlg (**A''',B'''**) s'accumule aussi au pôle antérieur, mais légèrement plus basal.

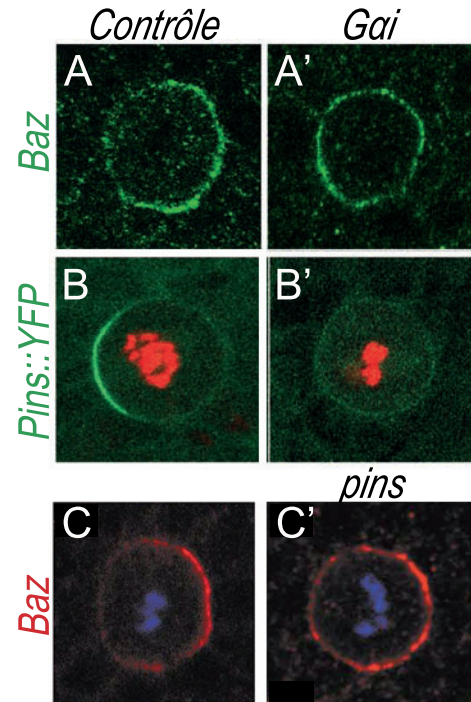
C-C''' En prometaphase, Vang (**C'**), Pins (**C''**) et Dlg (**C'''**) colocalisent au cortex antérieur.

FIGURE 29 – L'absence de Gai inhibe l'asymétrie de Baz et de Pins. Adapté de [David et al., 2005] et [Bellaïche et al., 2001]

AA' Immunomarquage, distribution de Baz en contexte sauvage (A) et mutant pour *Gai* (A'). Dans les mutants *Gai*, Baz se localise de manière uniforme autour du cortex dans 58% des cellules.

BB' Imagerie sur tissu vivant, distribution de Pins-GFP en contexte sauvage (B) et mutant pour *Gai* (B'). Dans les mutants *Gai*, Pins ne forme pas de croissant (100% des cellules).

CC' Distribution de Baz en contexte sauvage (C) et mutant pour *pins* (C'). Dans les mutants *pins*, l'asymétrie de Baz est moins prononcée que chez le sauvage.



vrai. Ainsi, une accumulation postérieure de Baz est toujours visible dans les mutants *pins*, mais elle est moins prononcée que chez le sauvage [Bellaïche et al., 2001] (Fig 29C'). L'activité même du complexe PAR semble être affectée dans ces mutants *pins* car un défaut de localisation de Pon au cortex antérieur est observé dans environ 50% des cellules observées. En revanche, un sauvetage en télophase sera observé pour ces cellules [Bellaïche et al., 2001].

Gai est une sous-unité α d'une protéine G hétérotrimérique, dont l'activité est indépendante d'un récepteur couplé à la membrane. Ric-8 (une GEF de *Gai*) promeut le passage de la forme GDP à la forme GTP. Une GAP (RGS-7 chez le *C.elegans*) permet ensuite le retour à la forme GDP, qui semble être la forme active dans cette voie. *Gai*-GDP se lie au motif GoLoco de Pins. *Gai* forme donc un croissant antérieur avec Pins dans la SOP (Pour revue [Willard et al., 2004]).

Les mutants *Gai*, affectent la localisation de Pins et de Baz dans la SOP. En effet, Pins n'est plus asymétrique (Fig 29B'), et Baz est distribué de manière uniforme autour du cortex dans près de 60% des SOP observées (Fig 29A'). De même, lorsque *ric-8*, est inhibé par ARN interférence, *Gai* perd sa localisation corticale, entraînant un défaut de symétrie du complexe PAR dans 75% des SOP observées [David et al., 2005].

Ainsi, si la localisation de Pins/*Gai* semble indépendante de la présence de Baz, le complexe antérieur promeut l'asymétrie de Baz au cortex postérieur. Cependant, 40% des SOPs montrent toujours une asymétrie de Baz dans les mutants *Gai*, et un sauvetage en

télophase est observé pour la localisation asymétrique de Pon dans les mutants *pins*. Il existe donc d'autres mécanismes contrôlant l'asymétrie du complexe postérieur dans la SOP.

3.3.3 Redondance de la voie PCP et des complexes antérieur et postérieur.

L'étude de la polarisation de la SOP dans des contextes doubles mutants a permis d'affiner la compréhension de la mise en place de l'asymétrie. Les doubles mutants *dsh,baz* et *Vang,baz* affectent la localisation asymétrique de Pins au cortex dans une grande partie des SOP observées, mais pas dans la totalité [Bellaïche et al., 2004]. Ces résultats montrent que la localisation asymétrique de Pins est régulée par plusieurs mécanismes redondants, dont la signalisation PCP et Baz. Cependant, tous les mécanismes sous-tendant le recrutement polarisé de Pins n'ont pas été élucidés. Les SOPs doubles mutants *pins,fz* perdent l'asymétrie de Baz, montrant que la voie de signalisation PCP et Pins sont nécessaires à l'asymétrie du complexe PAR.

Toutes ces études ont dévoilé différents mécanismes impliqués dans la polarisation de la SOP. Cependant, ce phénomène reste mal compris. Si la présence de la PCP et du complexe antérieur semble suffisante à la localisation asymétrique de Baz, les mécanismes recrutant Baz-Par-6-aPKC au pôle postérieur sont encore inconnus. De plus, la régulation de l'asymétrie de Pins-Gai est aujourd'hui encore incomprise.

3.4 Ségrégation asymétrique des déterminants cellulaires : la protéine Lgl.

Les déterminants cellulaires Numb et Neur se localisent au pôle antérieur de la SOP et sont hérités par la cellule antérieure qui donnera pIIb. Les études parues à ce jour analysent principalement la localisation asymétrique de Numb et de son partenaire Pon. Les mécanismes sous-tendant l'asymétrie de Neur ne sont pas connus, mais pourraient être, au moins en partie, communs à ceux de Numb.

Très vite l'importance du complexe PAR dans l'asymétrie de Numb a été évoquée. En effet, dans les clones *baz* soit Numb ne forme pas de croissant au cortex, soit ce croissant est très faible [Bellaïche et al., 2001]. Plus tard, Numb a été reconnue comme étant une cible d'aPKC [Smith et al., 2007]. Enfin, la phosphorylation de Numb par aPKC au pôle postérieur est responsable de l'asymétrie de Numb [Wirtz-Peitz et al., 2008].

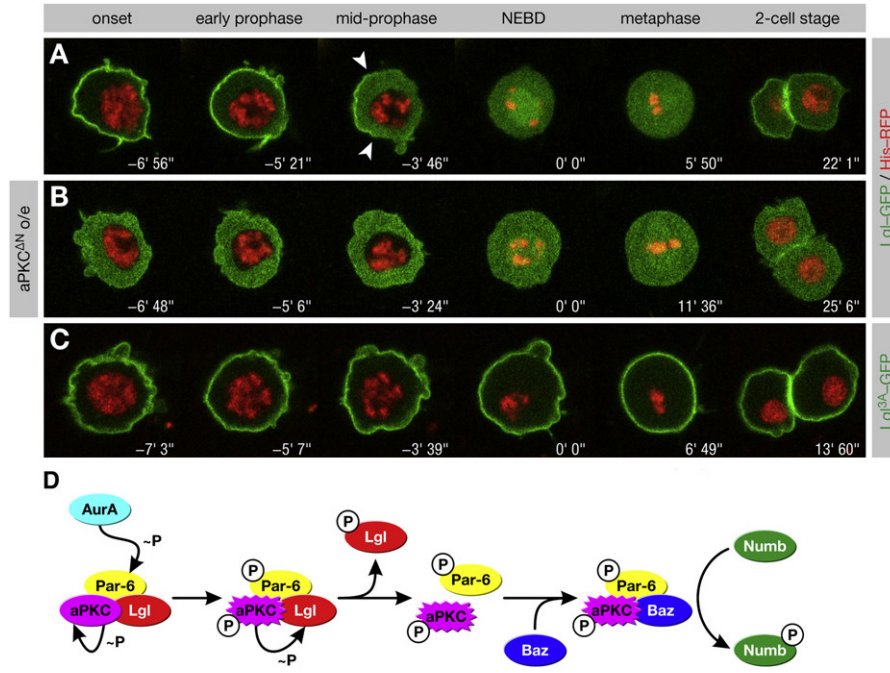


FIGURE 30 – Lgl et la formation du complexe PAR. Adapté de [Wirtz-Peitz et al., 2008]

Distribution de Lgl-GFP lors de la division des SOP. La distribution de l'enveloppe nucléaire correspond au temps $t=0$.

A Dans les SOP sauvages en prophase, Lgl-GFP se décroche progressivement du cortex. Tout d'abord relâché du cortex postérieur, une distribution asymétrique temporaire antérieure est observée en milieu (flèches). Lorsque l'enveloppe nucléaire disparaît, Lgl-GFP est entièrement cytoplasmique.

B L'expression d'une forme dominante négative d'aPKC provoque la localisation cytoplasmique de Lgl-GFP tout au long du cycle cellulaire.

C Inversement, la forme non phosphorylable de Lgl reste ancrée au cortex de la SOP tout au long de la division.

D Modèle de formation du complexe PAR en mitose. Par-6 et aPKC forment un complexe avec Lgl. Baz est exclue de ce cortex. A l'entrée en mitose, Aurora-A phosphoryle Par-6 sur sa S34, provoquant l'activation d'aPKC par auto-phosphorylation. aPKC exclut Lgl du complexe en la phosphorylant, provoquant son accumulation dans le cytoplasme. Baz peut alors se lier à Par-6 et aPKC. Le complexe PAR ainsi formé phosphoryle Numb.

Le travail de [Wirtz-Peitz et al., 2008] a clarifié l'enchainement des événements conduisant à l'asymétrie de Numb. Le modèle propose qu'à l'entrée en mitose de la SOP, Par-6-aPKC est en complexe avec Lgl, et Baz est absent de ce complexe. Ensuite, la kinase mitotique Aurora-A (AurA) phosphoryle Par-6 sur sa Serine34, phosphorylation induisant l'activité kinase d'aPKC envers Lgl. Lgl ainsi phosphorylée se détache de Par-6-aPKC pour devenir cytoplasmique [Betschinger et al., 2003], et Baz est désormais capable de se lier à Par-6-aPKC pour former le complexe PAR (Fig 30D). Cette étude montre joliment que le décrochage de Lgl du cortex se fait progressivement du pôle postérieur vers le pôle antérieur, sous-entendant que l'activité du complexe PAR est restreinte au pôle postérieur. Numb n'est ainsi phosphorylée et exclue que du cortex postérieur (Fig 30 A-C).

Dans les cellules sauvages le fuseau se forme d'abord sans orientation précise puis subit une rotation pour s'aligner le long de l'axe de polarité. De manière surprenante, seuls les mutants PCP *fz* et *dsh* affectent la rotation du fuseau. Ainsi dans 11% à 20% des cas, le domaine cortical ou les déterminants cellulaires s'accumulent est sectionné lors de l'anaphase, conduisant à la distribution symétrique de Numb et Neuralized dans pIIa et pIIb. En revanche la perte d'activité de *Vang* n'a pas d'impact sur l'orientation du fuseau mitotique [Bellaiche et al., 2001] [Gomes et al., 2009].

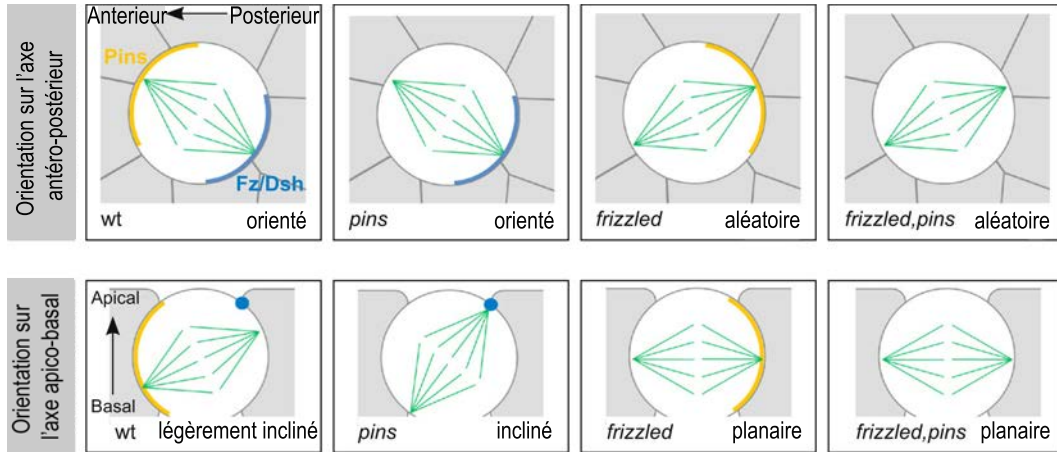


FIGURE 32 – Orientation du fuseau mitotique par Pins-Gai et Dsh-Fz. [Ségalen et al., 2010]

Représentation schématique de la localisation de Fz/Dsh et Pins, et des conséquences de leurs mutations sur l'orientation du fuseau mitotique.

SOPs sauvages Fz-Dsh s'accumulent au cortex apical postérieur, et Pins se localise au cortex antérieur. Depuis le pôle apical postérieur de la cellule Fz-Dsh orientent le fuseau mitotique le long de l'axe apico-basal. Au pôle antérieur, Pins attire lui aussi le fuseau, contrebalançant l'action de Fz-Dsh et maintenant le fuseau dans le plan de l'épithélium.

SOPs pins Il n'y a pas de défaut d'orientation de long de l'axe antéro-postérieur, mais le fuseau est plus orienté le long de l'axe apico-basal que chez le sauvage.

SOPs fz Le fuseau est orienté de manière aléatoire dans le plan de l'épithélium.

SOPs fz,pins Parce que l'activité de Pins est seulement requise pour contrebalancer l'action de Fz-Dsh sur le fuseau, les doubles mutants *fz,pins* ont un phénotype similaire aux mutants *fz* seuls.

Dans d'autres organismes (Mammifères, *C.elegans*) ou dans les neuroblastes de la Drosophile, La liaison de Gai-GDP à Pins modifie la conformation de cette dernière, permettant sa liaison à Mud (NuMA chez les mammifères), qui elle même se lie à la dynéine. Ce complexe Pins-Gai-Mud régule l'orientation du fuseau mitotique. Un phénomène similaire est observé dans les neuroblastes de *D.melanogaster*, (Figure 31) [Siller and Doe, 2009].

Une autre étude montre que dans la SOP, Mud/NuMA ne s'accumule pas seulement au pôle antérieur avec Pins-Gai, mais aussi au pôle postérieur avec Fz et Dsh. Il est aussi montré que Mud se lie directement à Dsh au pôle postérieur [Ségalen et al., 2010].

Dans [David et al., 2005] est mis en avant le rôle de Pins-Gai et de Fz dans l'orientation

du fuseau mitotique par rapport à l'axe apico-basal. Dans les cellules sauvages, le fuseau est orienté selon l'axe antéro-postérieur, mais aussi légèrement selon l'axe apico-basal : le pôle postérieur est apical, et le pôle antérieur est basal. Lorsque *Gai* est délocalisée dans le cytoplasme, le fuseau est toujours orienté selon l'axe antéro-postérieur, mais son orientation selon l'axe apico-basal est fortement accentuée. En revanche, dans les mutants *fz*, l'orientation selon l'axe apico-basal n'existe plus. Ainsi *Pins*, *Gai* et *Fz* sont requis pour contrôler l'orientation apico-basale du fuseau mitotique.

En conclusion, l'orientation du fuseau mitotique dépend du recrutement aux pôles antérieur via *Pins-Gai*, et postérieur via *Dsh* de *Mud*. Lorsque le pôle antérieur est affecté, seul *Dsh* au pôle apical postérieur recrute *Mud*, c'est pourquoi le fuseau suit particulièrement l'axe apico-basal. En revanche, lorsque le pôle postérieur est affecté (Mutants *dsh* ou *fz*), non seulement *Mud* n'est pas recruté au pôle postérieur, mais le croissant *Pins-Gai* est plus étendu que la normale. Ainsi, le croissant antérieur étendu peut recruter les deux pôles du fuseau, qui se formera parallèlement à la polarité de la cellule, conduisant à la distribution des déterminants dans les deux cellules filles (Fig 32).

Ce phénotype n'est pas observé dans les mutants *Vang* et *pk*. Une explication possible est que *Pins* forme toujours un croissant restreint au moment de la métaphase et suffit à l'établissement du pôle antérieur du fuseau mitotique, malgré la localisation de *Fz* tout autour du cortex.

3.6 Les indices d'une polarisation précoce du complexe PAR.

Toutes les études mentionnées précédemment ces sont focalisées sur la SOP au moment de sa mitose. Cependant plusieurs d'entre elles mentionnent la présence d'une polarisation de Baz avant l'entrée en mitose.

C'est ce qui est observé dans les SOPs en interphase à 16h30APF, donc peu de temps avant leurs division. Contrairement à ce qui est observé en mitose, cette accumulation de Baz est apicale, au niveau des jonctions adhérentes, et ne s'étend pas vers le domaine latéral (Fig 33A). En l'absence de *Fz* (clone mutant) la polarisation précoce de Baz est absente, ou plus faible que chez le sauvage (Fig 33B) [Bellaïche et al., 2001].

Certains contextes génétiques altèrent la transition entre l'asymétrie apicale précoce et l'asymétrie au cortex latéral observée en mitose. Ainsi, dans les mutants *dlg*, l'asymétrie apicale est visible en interphase et en prophase et n'est pas relocalisée vers le domaine latéral. Notons que l'asymétrie de Baz disparaît apicalement et latéralement en métaphase [Bellaïche et al., 2001] (Fig 33C-D'). De la même façon, en contexte *aurora*, l'asymétrie

précoce de Baz est toujours observée, mais la protéine n'envahit pas le domaine latéral au moment de la mitose [Wirtz-Peitz et al., 2008]. (Fig 34A-D)

FIGURE 33 – Polarisation précoce de Baz : Fz et Dlg, adapté de [Bellaïche et al., 2001].

A-B Section apicale du notum : Une accumulation apicale postérieure de Baz dans les SOP sauvages en interphase est visible. (A, SOP marquée par un astérisque). Cette accumulation diminue fortement dans les mutants *fz* (B).

C-D' Section basale du notum. Dans les SOP sauvages en mitose, Baz envahit le domaine basolatéral (CC'). Dans les mutants *dlg*, l'accumulation apicale en interphase est toujours présente, mais Baz n'envahit pas le domaine baso-latéral (DD').

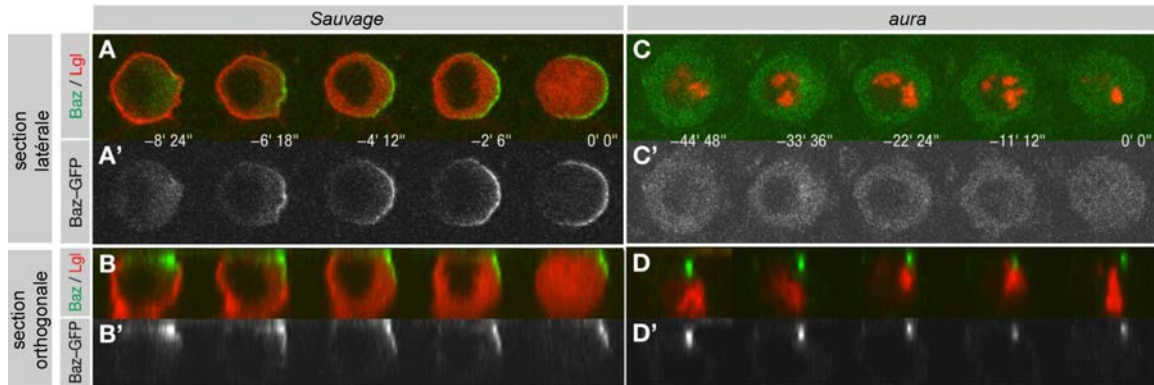
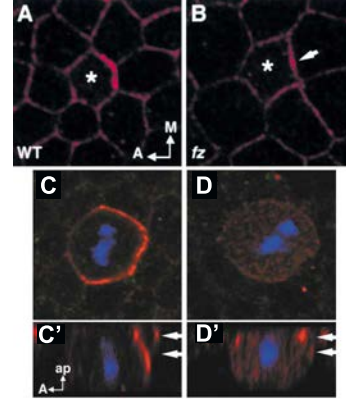


FIGURE 34 – Polarisation précoce de Baz : Aurora-A. [Wirtz-Peitz et al., 2008]

AA', CC' Sections latérales de SOP en mitose. Chez le sauvage, Baz s'accumule au cortex latéral des SOP (AA'). Cette accumulation n'a pas lieu dans les mutants *aura* (CC').

BB', DD' Sections orthogonales de SOP en mitose. En début de prophase, une accumulation apicale postérieure de Baz est visible chez le sauvage, progressivement Baz envahit le domaine latéral. (BB'). Dans les mutants *aura*, l'accumulation apicale postérieure de Baz est visible, mais elle n'envahit pas le domaine latéral (DD').

Ces études montrent la présence d'une polarisation de Baz avant l'entrée en mitose, sous-entendant que la mise en place de l'asymétrie dans les SOP se fait avant leur division.

Deuxième partie

Résultats

Chapitre 1

Objectifs

1.1 Porter un nouveau regard sur la SOP

Bien que la SOP soit un modèle couramment utilisé dans l'étude des divisions asymétriques, rares sont les études s'étant arrêtées sur son statut de cellule épidermale, d'autant plus que le notum n'est que sporadiquement utilisé dans l'étude des épithéliums. Pourtant, la localisation de Baz et de Par-6-aPKC, respectivement au domaines jonctionnel et apical dans d'autres épithéliums de *Drosophile* [Harris and Peifer, 2005] [Walther and Pichaud, 2010] [Morais-de Sá et al., 2010] soulève de nombreuses questions quand à la mise en place de l'asymétrie dans la SOP. De la même façon, si différents laboratoires ont mentionné une asymétrie de Baz au pôle apical postérieur avant l'entrée en mitose [Bellaïche et al., 2001] [Wirtz-Peitz et al., 2008], toutes les analyses se focalisent sur le croissant latéral postérieur du complexe PAR pendant la mitose. Pour appréhender les mécanismes menant à l'asymétrie du complexe PAR, différents axes devaient être abordés.

A quel moment l'asymétrie apparait-elle ? Les SOP sont spécifiées au sein du notum dix heures après la formation de la puppe [résultats non publiés], pour se diviser environ sept heures plus tard. Puisque les cellules n'ayant pas acquis le destin de SOP se divisent uniquement de manière symétrique, c'est au cours de ces sept heures que les SOP enclenchent les mécanismes menant à leur division asymétrique. En conséquence, l'asymétrie de Baz doit aussi apparaître dans cette fenêtre de temps.

A quel moment le complexe PAR se forme-t-il ? La formation du complexe PAR est nécessaire à la phosphorylation et à la localisation asymétrique de Numb [Wirtz-Peitz et al., 2008]. Mais la formation du complexe est-elle requise pour son asymétrie ? Les membres du complexe se polarisent-ils en complexe ou les uns indépendamment des autres ? Les études menées jusqu'à présent se sont focalisées sur la localisation asymétrique

de Baz [Bellaïche et al., 2001] [David et al., 2005] [Ségalen et al., 2010] [Wirtz-Peitz et al., 2008]. Les conséquences de mutations de *Fz*, *pins*, ou encore *Gai* sur la polarisation de Par-6 et de aPKC restent donc floues. De même, l'existence d'une accumulation au pôle postérieur apical dans les SOP en interphase de Par-6 et aPKC n'a pas été montrée. Nous ne savons donc pas si les trois membres du complexes se polarisent en même temps, ou encore si leur polarisation nécessite des mêmes mécanismes.

Comment la polarité apico-basale de la SOP est-elle remaniée ? Le simple fait que les protéines du complexe PAR soient impliquées dans la division asymétrique de la SOP et dans la polarité épithéliale du notum sous-entend que la polarité apico-basale est remaniée lors de cette division. D'une part les trois membres du complexe PAR sont des protéines apicales (ou jonctionnelles), lorsque Par-6 aPKC et Baz envahissent le domaine latéral postérieur, l'organisation de la polarité apico-basale de la SOP est profondément altérée. D'autre part, si Par-6 et aPKC se localisent au pôle apical et Baz au niveau des jonctions de l'épithélium, leur régulation doit être modifiée pour former le complexe PAR capable de phosphoryler Numb [Wirtz-Peitz et al., 2008]. Encore une fois, l'asymétrie de Baz au pôle postérieur avant la mitose laisse penser que le remaniement de la polarité épithéliale commence avant la mitose de la SOP.

Au cours de ma Thèse, pour comprendre les mécanismes menant à la mise en place de l'asymétrie dans la SOP, je me suis donc concentrée sur le remodelage de la polarité épithéliale avant la mitose, en me focalisant sur la régulation de Baz, Par-6 et aPKC.

1.2 Avec quels outils ?

La mise en place de l'asymétrie se faisant vraisemblablement dans les sept heures précédant la division, j'ai voulu observer l'évolution de la localisation des membres du complexe PAR dans cette fenêtre de temps, et mesurer leur asymétrie. Les SOP étant entourées de cellules épidermales se divisant de façon symétrique, j'ai également suivi la distribution de Baz, Par-6 et aPKC dans ces cellules. Ainsi, le notum me permettait d'observer à la fois la division asymétrique de la SOP, et d'avoir un contrôle, la division symétrique des cellules épidermales, dans une même expérience.

L'étude de la mise en place de l'asymétrie des membres du complexe PAR au cours du temps ne pouvait être basée sur une simple observation humaine. En effet, je cherchais à observer l'apparition de l'asymétrie, et allais être amenée à étudier une asymétrie de faible magnitude. Ainsi, pour pouvoir déceler de faibles asymétries, et s'affranchir des

biais "humains" de l'observation, une méthode d'analyse automatique quantitative de l'asymétrie au cours du temps a été développée.

Les protéines de polarité propres aux épithéliums régulant la localisation des protéines PAR [Walther and Pichaud, 2010] [Morais-de Sá et al., 2010] [Benton et al., 2002], je me suis intéressée au rôle qu'elles pouvait tenir dans la mise en place de l'asymétrie de la SOP, mais également dans la régulation de la formation du complexe PAR.

Enfin, c'est aussi au cours des sept heures précédant leur division que les SOP acquièrent leur identité. Au laboratoire, nous avons formulé l'hypothèse qu'il existe un programme transcriptionnel spécifique de la SOP, permettant la division asymétrique. L'étude comparative des transcriptomes des SOP et des cellules épithéliales non-SOP du notum nous proposera une liste de gènes potentiellement impliqués dans la division asymétrique.

Chapitre 2

Résumé des résultats :

Division asymétrique d'une cellule épithéliale : suite au remodelage des jonctions et à l'inhibition de Crumbs dans la SOP, la PCP induit la polarisation.

Résumé en français de l'article présenté en Chapitre 3.

Résultats obtenus conjointement avec Fred Bernard, post-doctorant du laboratoire.

2.1 Développement d'une méthode de mesure quantitative de l'asymétrie

Afin de détecter la mise en place de l'asymétrie de Baz, Par-6 et aPKC dans les SOP en interphase, nous voulions suivre la distribution de ces protéines dans les sept heures précédant leur division. Malheureusement les mouvements morphogénétiques entre 10h et 13h30 après la formation de la puppe (APF) rendent l'observation du notum difficile pendant cette fenêtre de temps. Ainsi, la polarisation de constructions Baz, Par-6 et aPKC couplées à la GFP, et exprimées sous le contrôle de leur promoteur endogène, fut étudiée de 13h30 APF jusqu'à la division des SOP. Avant la mitose, aucune localisation latérale des protéines du complexe PAR n'est visible dans les cellules du notum. Nous nous sommes donc focalisés sur les plans les plus apicaux de l'épithélium, et avons développé un programme mesurant l'asymétrie planaire (ou polarisation planaire) de nos trois protéines d'intérêt (Article : figure 1).

Ce programme fut développé en collaboration avec Hervé Rouault (ancien post-doctorant du laboratoire, actuellement à Janelia Farm, Ashburn, USA). Pour chaque cellule, et à chaque point de temps, le contour de la cellule est extrait (c'est à dire le signal GFP sub-apical) et un vecteur de polarité est calculé à partir de ce contour. La mesure obtenue est indépendante de l'intensité globale de la cellule, ou de sa forme (les détails du calcul de ce vecteur sont développés dans l'annexe A). Nous avons étudié indépendamment la norme du vecteur, c'est à dire sa longueur, ainsi que son orientation par rapport à l'axe antéro-postérieur (Article : figure 1).

2.2 Baz, Par-6 et aPKC sont polarisées avant l'entrée en mitose

L'analyse des vecteurs de polarisation de Baz, Par-6 et aPKC dans les SOP et les cellules épidermales montre, dès le début de l'acquisition, une différence de norme entre les deux types de cellule (seule la moyenne de tous les vecteurs de polarisation est étudiée, cf. Annexe A). Au cours du temps la norme des vecteurs des SOP augmente et celle des cellules épidermales reste stable. En parallèle, les vecteurs des SOP s'orientent progressivement vers le pôle postérieur (Article : figure 2).

Les cellules épidermales présentent une norme de polarisation non nulle, suggérant que ces cellules possèdent une faible polarisation, orientée aléatoirement. L'autre possibilité serait que la norme de polarité mesurée est due à la présence d'agrégats de protéines, répartis aléatoirement sur le contour de la cellule, mais tirant les vecteurs de polarité vers eux. Notre collaborateur Francis Corson (LPS, ENS, Paris, France), a calculé la norme de cellules théoriques non polarisées, en prenant en compte ces agrégats, pour chaque génotype et chaque type cellulaire. Ces cellules synthétiques (ou cellules théoriques) ont une norme correspondant à celle mesurée expérimentalement dans les cellules épidermales. Ainsi, la norme non-nulle observée dans les cellules épidermales est due à la localisation aléatoire d'agrégats de protéines sur le contour de la cellule. La comparaison des données expérimentales aux cellules synthétiques nous indique que les SOP ne sont pas polarisées en début d'acquisition, mais que leur asymétrie apparaît plus tard, environ 125 minutes avant la division (Article : figure 2).

En développant une mesure quantitative de la polarité planaire de Baz, Par-6 et aPKC au cours du temps, nous avons mis en évidence la polarisation de ces trois protéines dans la SOP avant l'entrée en mitose. En comparant les données expérimentales aux cellules synthétiques, nous avons aussi pu observer l'apparition de l'asymétrie dans la SOP.

2.3 La PCP est responsable de la disparition de la symétrie.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux mécanismes régulant l'asymétrie de la SOP en interphase. Dans la SOP en mitose la PCP oriente la division selon l'axe antéro-postérieur et est redondante avec le complexe antérieur Pins-Gai dans l'asymétrie de Baz. En revanche, l'inhibition de la signalisation PCP seule n'a qu'un faible impact sur la formation du croissant latéral de Baz en métaphase [Bellaïche et al., 2001]. Néanmoins, dans la SOP en interphase, l'inhibition de la signalisation PCP abolie la polarisation de la SOP. En effet, les normes mesurées expérimentalement ne se distinguent plus de celles des cellules synthétiques (Article : figure 3).

Deux conclusions peuvent être tirées de ces observations. Tout d'abord la PCP est nécessaire à la mise en place de la polarisation des SOP en interphase. Enfin, il existe un mécanisme de "sauvetage en mitose" permettant l'asymétrie de Baz dans la cellule en division lorsqu'elle a échoué en interphase.

2.4 Un remodelage de la polarité épithéliale spécifique des SOP entraine leur polarisation.

La PCP est responsable de l'apparition de l'asymétrie, mais bien qu'elle soit présente dans tout le tissu, seules les SOP se polarisent. Nous nous sommes donc intéressés aux disparités entre SOP et cellules épidermales pouvant être responsables de cette différence d'interprétation de la PCP. Sous l'hypothèse que les SOP enclenchent un programme transcriptionnel spécifique leur permettant de se polariser, nous avons comparé les transcriptomes des SOP et des cellules épidermales. En collaboration avec Michel Gho (CNRS, UMR7622 et UPMC, Paris, France), Lydie Couturier et Khalil Mazouni (membres du laboratoire), ont isolés environ 300 SOP et cellules épidermales par dissection laser (LCM) [Buffin and Gho, 2010]. Les ARN totaux de ces cellules furent extraits, et les ADN complémentaires (ADNc) correspondant furent produits. Après une étape d'amplification, les ADNc furent séquencés. Les transcriptomes des deux types de cellules furent ensuite comparés, et une liste de 576 gènes dont l'expression diffère dans les SOP et les cellules épidermales fut fournie (Article : figure 5).

Deux gènes de cette liste ont attiré notre attention et ont été étudiés en détails.

2.4.1 L'inhibition de *p120ctn* induit le remodelage des jonctions de la SOP, induisant la polarisation

L'expression de plusieurs organisateurs des AJ est diminuée dans les SOP. Confirmant des disparités de régulation des AJ entre SOP et cellules épidermales, les deux types de cellules diffèrent par leur forme. Les SOP ont une plus petite surface apicale et une forme plus convexe que les cellules épidermales (la méthode d'analyse de la forme des cellules est décrite dans l'annexe B). De plus, le recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) de la protéine Cad couplée à la GFP (Cad-GFP) est plus grande dans les cellules épidermales que dans les SOP (la méthode d'analyse des données FRAP est développée dans l'annexe C) (Article : figure 6).

Nous avons ensuite étudié le rôle de *p120ctn*, dont l'expression est spécifiquement inhibée dans les SOP.

Son inhibition dans le notum abolie les disparités de FRAP de Cad-GFP et de convexité de forme entre SOP et cellules épidermales. De plus, l'inhibition de *p120ctn* augmente la polarisation de Par-6 et Baz dans les SOP en interphase. Pour approfondir notre étude de la dynamique des jonctions, nous avons analysé par FRAP GFP-Baz, Par-6-GFP et aPKC-GFP. Si Par-6-GFP et aPKC-GFP ne montrent pas de différences de recouvrement de fluorescence entre les deux types de cellules, le recouvrement de GFP-Baz est plus élevé dans les SOP que dans les cellules épidermales. Tout comme pour Cad-GFP, cette différence est annulée lorsque *p120ctn* est inhibée (Article : figure 6).

Ensemble, ces résultats indiquent que les AJ sont spécifiquement remodelées dans les SOP, en partie suite à l'inhibition spécifique de *p120ctn* dans ce type cellulaire. Suite à l'inhibition de *p120ctn*, GFP-Baz est plus mobile aux jonctions et la polarisation de la SOP est augmentée. Ces observations soulèvent l'hypothèse que le remodelage des jonctions conduit à la libération de Baz et à la polarisation des SOP. Notons néanmoins que la polarisation des cellules épidermales n'est pas augmentée lors de l'inhibition de *p120ctn*, indiquant que cette dernière n'est pas suffisante à la polarisation d'une cellule du notum.

2.4.2 L'inhibition d'*expanded* promeut l'internalisation de Crumbs, induisant la polarisation

Le complexe PAR doit être formé pour permettre la ségrégation asymétrique des déterminants cellulaires [Wirtz-Peitz et al., 2008]. Or, dans différents épithéliums de *Drosophila*, la protéine apicale Crumbs inhibe l'interaction de Baz avec Par-6-aPKC [Walther

and Pichaud, 2010] [Morais-de Sá et al., 2010]. Nous nous sommes donc intéressés à la distribution de Crumbs dans les deux types cellulaires du notum. Au cours du temps, la protéine Crb-GFP, exprimée sous le contrôle de son promoteur endogène, s'accumule progressivement au pôle apical (hors domaine subapical) des SOP (Le calcul de l'intensité moyenne dans cette région apicale est décrite dans l'annexe B). Ainsi, la localisation de Crumbs diffère entre SOP et cellules épidermales. De plus, le calcul des vecteurs polarité pour Baz et Par-6 dans des clones mutants *crb* montre une augmentation de la polarisation des SOP (Article : figure 4).

Ensemble, ces résultats indiquent qu'une régulation de Crumbs spécifique des SOP existe, et qu'elle pourrait être impliquée dans la polarisation des SOP.

expanded(ex) est spécifiquement sous-exprimée dans les SOP, et est connue pour se lier à Crumbs [Ling et al., 2010] et inhiber son internalisation dans l'épithélium folliculaire [Fletcher et al., 2012]. Confirmant cette donnée, Lydie Couturier a mené un test d'endocytose [Bellen et al., 2014] dans le disque d'aile, et observé une augmentation de l'endocytose de Crumbs quand *ex* est inhibé. De même, la localisation de Crumbs dans le notum est perturbée en l'absence d'*ex*. Confirmant que la déstabilisation de Crumbs agit positivement sur l'asymétrie de la SOP, la polarisation de Baz et de Par6 est augmentée lorsque *ex* est inhibé dans le notum (Article : figure 7).

Ces résultats indiquent que l'inhibition d'*ex* spécifiquement dans les SOP provoque une déstabilisation de Crumbs, conduisant à l'asymétrie de Baz et de Par-6. Tout comme pour *p120ctn*, l'inhibition d'*ex* n'augmente que l'asymétrie des SOP, indiquant qu'elle n'est pas suffisante à la polarisation planaire des cellules épidermales. Le rôle connu de Crumbs dans l'inhibition de l'interaction entre Baz et Par-6-aPKC [Walther and Pichaud, 2010] [Morais-de Sá et al., 2010] laisse supposer que la déstabilisation de Crumbs permet la formation du complexe PAR dans les SOP. Allant dans le sens de cette hypothèse, nous avons observé que l'inhibition de *baz* abolit la polarisation de Par-6 et aPKC et inversement. Ainsi, la formation du complexe PAR semble être indispensable à sa polarisation, et lorsque la formation du complexe est favorisée (absence de *crb*, ou de *ex*), une augmentation de la polarisation est observée.

2.5 Modèle

Nous avons montré que la perturbation de la voie de signalisation PCP abolit la polarisation des SOP alors que le remodelage des jonctions et l'absence de Crumbs l'amplifie. Vps35 est un régulateur positif de Crumbs [Pocha et al., 2011] [Zhou et al., 2011], et son

inhibition induit, comme le prédit notre modèle, une augmentation de la polarisation de Par-6. Néanmoins, l'inhibition simultanée de *Vang* et de *vps35* provoque une perte totale de la polarisation de Par-6-GFP (Article : figure 4). Ainsi, même lorsque *crb* est inhibé, la polarisation reste dépendante de la PCP.

Toutes ces observations nous permettent de proposer un modèle de polarisation de la SOP en interphase (Figure 35). Dans la SOP est enclenché un programme transcriptionnel permettant la mise en place de l'asymétrie. L'expression d'*ex* est diminuée, entraînant l'internalisation de Crumbs, et la libération de Par-6 et aPKC. De même, par l'inhibition de l'expression de *p120ctn*, les AJ sont remaniées, augmentant la mobilité de Baz. Puisque la formation du complexe PAR favorise sa polarisation, il est probable que le remodelage de jonctions libère Baz de son association à β -caténine et/ou Ed, permettant sa liaison à Par-6 et aPKC. Dans ces deux contextes, la polarisation des cellules épidermiques n'est pas augmentée, nous proposons donc que ces deux niveaux de régulation sont nécessaires à la polarisation de la SOP. Enfin, puisque la signalisation PCP est indispensable à la polarisation, nous proposons qu'une fois Par-6-aPKC dissocié du domaine apical et Baz dissocié des jonctions, le complexe PAR se forme et devient apte à interpréter le signal PCP, brisant la symétrie de la cellule.

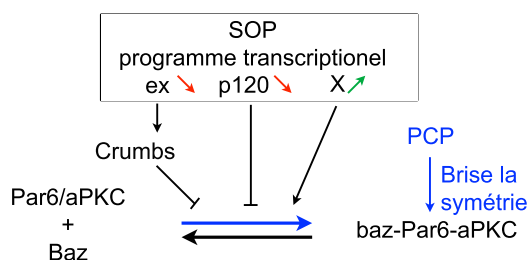


FIGURE 35 – Modèle : Mise en place de l'asymétrie dans la SOP.

Le programme transcriptionnel de la SOP favorise la formation du complexe PAR. L'inhibition d'*ex* provoque l'internalisation de Crumbs, conduisant à la formation du complexe. Le remodelage des jonctions par la diminution de l'expression de *p120ctn* libère Baz des jonctions et favorise la formation du complexe. D'autres facteurs, spécifiquement exprimés dans la SOP, peuvent aussi participer à la formation du complexe Baz-Par-6-aPKC. Le complexe PAR ainsi formé lit la PCP et se localise au pôle postérieur de la SOP.

Chapter 3

Article :

Symmetry breaking by Planar Cell Polarity, Crumbs
down-regulation and junction remodeling direct
asymmetric cell division in a *Drosophila* epithelium

C. Besson^{*1,2,3}, F. Bernard^{*1,2}, K. Mazouni^{1,2}, F. Corson^{1,5}, H. Rouault^{1,2,4},
L. Couturier^{1,2}, A. Keder^{1,2}, M. Gho^{6,7} and F. Schweisguth^{1,2,8}

1. Institut Pasteur, rue du Dr Roux 75015 Paris, France
2. CNRS, URA2578, rue du Dr Roux, 75015 Paris, France
3. UPMC, Cellule Pasteur, rue du Dr Roux, 75015 Paris, France
4. present address : Janelia Farm, HHMI, Ashburn, VA 20147, USA
5. present address : LPS, ENS, rue d'Ulm, 75005 Paris, France
6. CNRS, UMR7622, place Jussieu, 75005 Paris, France
7. UPMC, place Jussieu, 75005 Paris, France
8. corresponding author: fschweis@pasteur.fr

* co-first author

7 Figures

Supplemental Materials: 6 Figures, 2 Table

Running head: Polarization of an asymmetrically dividing epithelial cell

Abstract

The epithelial Sensory Organ Precursor cells (SOPs) divide asymmetrically within the plane of the notum epithelium in *Drosophila*. Planar polarization of mitotic SOPs critically depends on the asymmetric distribution of the PAR polarity complex. When and how this complex first localizes asymmetrically is unknown. Here, we show that Bazooka (Baz), Par6 and atypical Protein Kinase C (aPKC) become planar polarized prior to mitosis and identify Planar Cell Polarity (PCP) as the initial symmetry breaking input. The apical protein Crumbs antagonizes the planar polarization of the Baz-Par6-aPKC complex in SOPs. Expanded (Ex) and p120/catenin (p120ctn) acts as cell-specific regulators of Crumbs and AJ dynamics, respectively, that negatively regulate planar polarization in SOPs. We propose a model whereby decreasing levels of Ex and p120ctn in SOPs increases free Par6-aPKC and Baz to promote the formation and polarization of the Baz-Par6-aPKC complex. Thus, our study links fate determination to asymmetric cell division and provides a general framework to understand how epithelial cells can divide asymmetrically despite having junctions.

Introduction

During development, cell fate diversity can be generated by asymmetric cell division whereby a mother cell produces two daughters with distinct developmental potential. This fate asymmetry can result from the unequal segregation at mitosis of cell fate determinants¹. The cellular, molecular and physical bases underlying this process have been very well studied in the *C. elegans* one-cell embryo and in the *Drosophila* neuroblasts. In these two model systems, cell polarization involves the formation of two opposing cortical domains in the absence of cell-cell junctions. In *C. elegans*, fertilization provides a symmetry-breaking input that modifies locally the contractility of the actomyosin meshwork. This in turn leads to the formation of an anterior domain defined by a complex formed by the polarity proteins Par3, Par6 and atypical Protein Kinase C (aPKC)^{2, 3}. In the *Drosophila* embryo, epithelial cells fated to become neuroblast disassemble their junctions and delaminate from the epithelium. As they delaminate, neuroblasts keep their apical-basal polarity with Bazooka (Baz; fly Par3), Par6 and aPKC localizing apically and forming an apical complex that directs asymmetry at mitosis^{1, 4, 5}. Thus, no junctions are present in these two model systems. Interestingly, a study has proposed that junctions actually inhibit asymmetric cell division in the *Drosophila* embryo⁶. Thus, how polarized epithelial cells divide asymmetrically despite having cell-cell junctions is unclear.

The *Drosophila* Sensory Organ Precursor cells (SOPs) are epithelial cells that divide asymmetrically within the plane of the thoracic epithelium, or notum, during pupal development⁷⁻⁹. Thus, SOPs provide an interesting model to study asymmetric cell division in an epithelium. The pupal notum comprises two types of epithelial cells, the epidermal cells (epi) and the SOPs. While epi cells divide symmetrically and in a randomly oriented manner to produce two epi cells, SOPs divide asymmetrically and along the fly body axis to generate an anterior (a) pIIb cell and a posterior (p) pIIa cell⁷. Fate asymmetry depends on the unequal segregation of the cell fate determinants Numb and Neuralized that regulate Notch activation in pIIa and Notch inhibition in pIIb¹⁰⁻¹². The a-p orientation of the SOP division depends on Planar Cell Polarity (PCP)^{7, 13-15}: in the absence of PCP, SOPs divide with a random planar orientation but still asymmetrically. This indicated that PCP is not essential to establish asymmetry in SOPs at mitosis. Thus, PCP is thought to provide a spatial bias in the still unknown planar polarization process that governs SOP asymmetry.

The Baz-Par6-aPKC complex localizes asymmetrically at the posterior pole of dividing SOPs. Asymmetric Baz-Par6-aPKC is critical for the polar distribution of Numb and Neur^{1, 16} and, together with PCP¹⁷, it also regulates the a-p orientation of the mi-

totic spindle, thereby ensuring the unequal segregation of cell fate determinants, hence fate asymmetry. It is therefore essential to understand how the Baz-Par6-aPKC complex forms at the posterior cortex of SOPs.

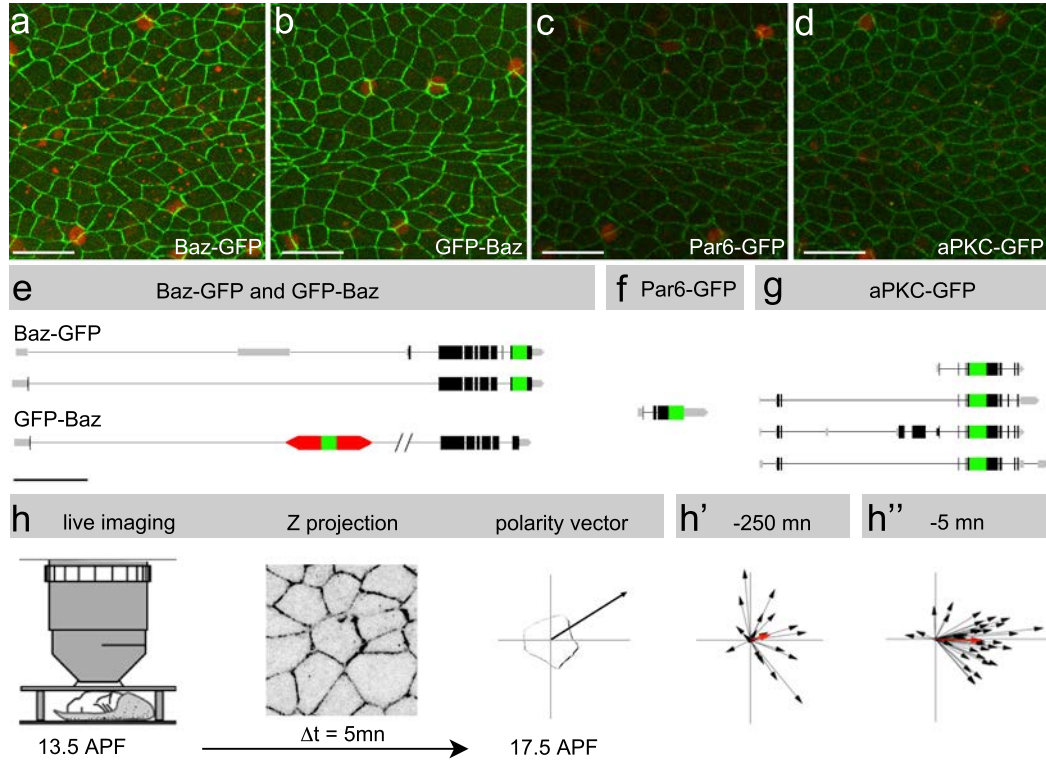
In epithelial cells, the main apical polarity proteins have traditionally been grouped into two distinct complexes, the Par3-Par6-aPKC complex and the Crumbs (Crb) complex. This categorization has, however, recently been revised as a dynamic interplay exists between these two complexes. Par6 interacts also with Crb in the apical domain and this interaction inhibits the formation of the Baz-Par6-aPKC complex¹⁸⁻²². Also, Par3/Baz interacts with Armadillo (Arm, fly *beta*-catenin) and Echinoid (Ed, fly Nectin) at Adherens Junctions (AJs)²³⁻²⁵. Whether these dynamic interactions modulate the formation of the Baz-Par6-aPKC complex at the posterior cortex of SOPs is completely unknown.

These studies raised several questions that are key for our understanding of asymmetric cell divisions in epithelia: how and when is planar asymmetry first established in SOPs? Is asymmetry established upon mitotic entry, for instance via the activation of Par6-aPKC by mitotic kinases²⁶? Alternatively, do Baz, Par6 and/or aPKC localize asymmetrically in SOPs prior to mitosis? Also, what is the initial symmetry breaking input? Finally, since PCP operates across all cells of this epithelium, what are the mechanisms that render SOPs but not epi cells responsive to PCP for spindle orientation?

To address these questions, we have developed a quantitative live imaging approach to study the planar polarization of SOPs prior to mitosis. This identified PCP as the initial symmetry breaking input. Molecular analysis of the SOP-specific genetic program identified Expanded (Ex) and p120/catenin (p120ctn) as candidate regulators of Crb and AJs that are expressed at lower levels in SOPs. Functional analysis of Ex and p120ctn suggested a model whereby the release of Baz from AJs and of Par6-aPKC from Crb promote the formation of the Baz-Par6-aPKC complex in SOPs. Formation of this complex is proposed to render SOPs responsive to PCP, thereby explaining the SOP-specific planar polarization of the Baz-Par6-aPKC complex.

Results

A quantitative live imaging assay for planar polarization



Article Figure 1 – A quantitative analysis of planar polarization

(a-d) localization of Baz-GFP (a), GFP-Baz (b), aPKC-GFP (c) and Par6-GFP (d) in the notum of living 13 hr APF pupae (GFP-tagged proteins, green). SOPs were identified using *neur-H2B-RFP* (red). Scale bars = 20 μm. (e-g) Schematic representation of the GFP-tagged genomic constructs (exons are shown as boxes; coding and non-coding sequences are in black and grey, respectively; GFP, green; not all isoforms are shown). All Baz and isoforms are tagged in Baz-GFP whereas GFP-Baz (protein trap line associated with the insertion of a P-element, red) does not tag the A isoform (e). All aPKC isoforms are tagged in aPKC-GFP (g). Scale bar = 5kb. (h) live spinning-disk imaging of staged pupae (left) produced 5D (x,y,z,c,t) movies. Following z-projection of selected apical planes (middle), a polarity vector was measured using the extracted contour of a given cell (right). (h',h'') Plots showing the GFP-Baz polarity vectors (black) at t=-250 (h') and t=-5 mn before mitosis. At each time point, the mean polarity vector is in red. In this and all other figures, anterior is right and medial is top.

To study when and how Baz, Par6 and aPKC localize asymmetrically in SOPs, we generated and/or used functional GFP-tagged proteins (Figure 1a-g; see Methods). Baz-GFP is a BAC-encoded fusion protein that tags all Baz isoforms (this study) whereas GFP-Baz is a protein-trap tagging two of the Baz isoforms²⁷. aPKC-GFP is also a BAC-encoded fusion protein designed to tag all aPKC isoforms (this study) and Par6-GFP is a genomic rescue construct²⁸. These GFP-tagged proteins localized at the cell cortex in the notum of living pupae (Figure 1a-d) and localized at the posterior pole of dividing

SOPs (Figure S1)

To quantitatively study the polar distribution of Baz, Par6 and aPKC in individual cells, we moved away from partly subjective, hence error-prone, categorization, such as scoring 'polar' vs 'non-polar' cases, and developed a quantitative approach. Briefly, spinning-disk microscopy was used to image the notum epithelium of developing pupae and produce 5D movies (x,y,t,c,z). After maximal projection of apical z-planes, the contour of individual cells was extracted and an intensity-normalized polarity vector was calculated at each time point using the intensity and the position relative to the barycenter of each pixel from the extracted contour (Figure 1h and Figure S2; see Methods). The magnitude informed about the anisotropy of the cortical distribution of the GFP-tagged marker while the direction informed about the orientation of this planar polarization relative to the anterior-posterior (a-p) axis. Thus, high magnitude values and posterior direction reflect planar polarization along the a-p axis. Using this approach, a polarity vector was measured every 5 min for each cell and for each genotype. To compare the dynamics of polarization in different cells, a relative time scale was used with t=0 corresponding to mitotic entry. At t=-250 min, the Par6 polarity vectors measured in SOPs appeared randomly oriented (Figure 1h') whereas they were clearly oriented towards the posterior pole prior to mitosis (Figure 1h'').

Baz, Par6 and aPKC are planar polarized prior to mitosis

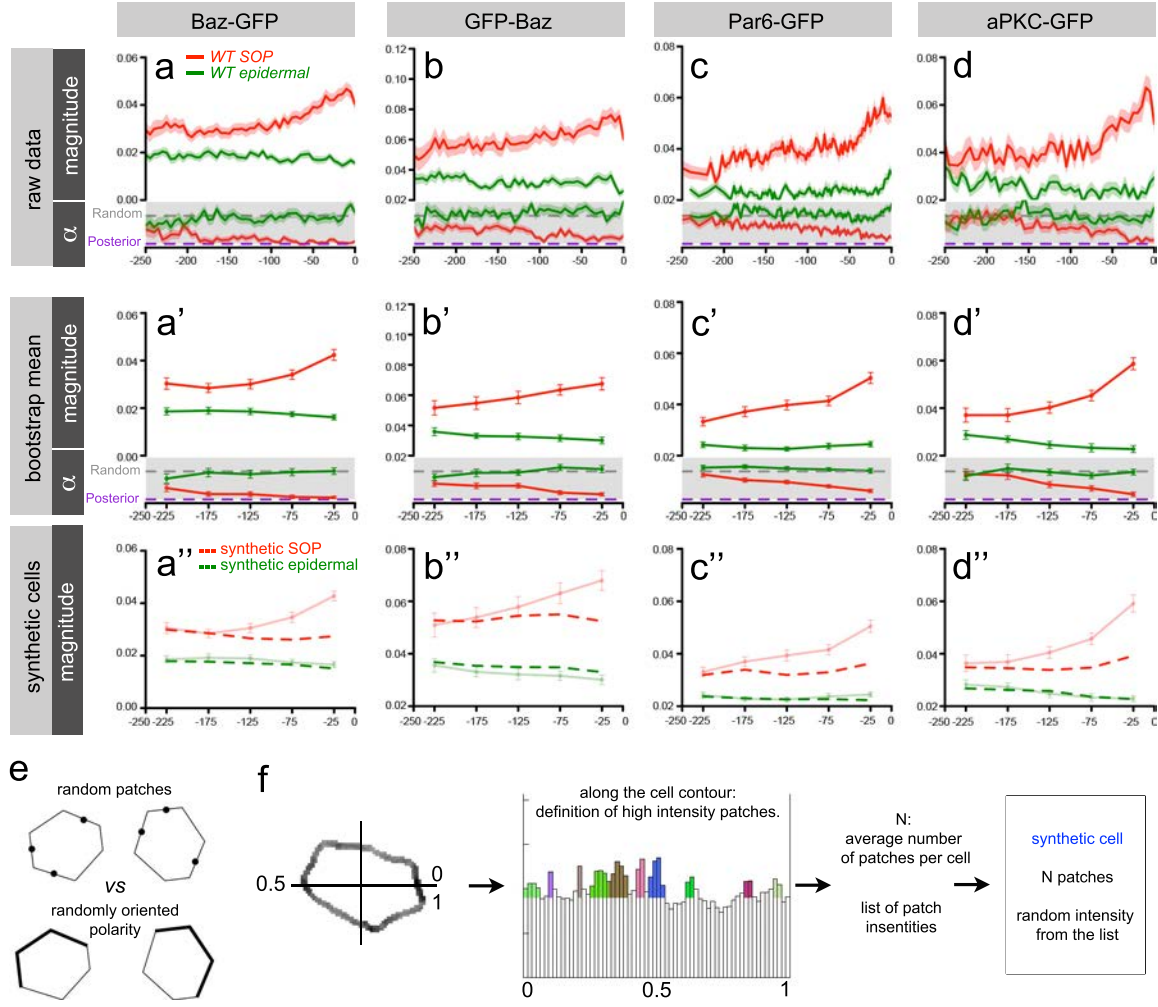
This approach was used to measure the planar polarization of Par6-GFP, GFP-Baz, Baz-GFP and aPKC-GFP in SOPs and epi cells from 13.5 to 17.5 hr APF. The magnitude and direction (α) of these polarity vectors were plotted over time (Figure 2a-d) and averaged using a bootstrap approach (Figure 2a'-d'). Par6-GFP, GFP-Baz, Baz-GFP and aPKC-GFP were planar polarized along the a-p axis in SOPs just prior to division (t=-25). This polar distribution was consistent with the asymmetric and oriented mode of division of SOPs^{7, 16}. By contrast, the Baz, Par6 and aPKC polarity vectors had lower magnitude values at t=-225. Moreover, the Par6 and aPKC vectors were randomly oriented whereas the Baz polarity vectors showed a weak bias towards the posterior pole. For all vectors, magnitude increased over time in SOPs as they progressively oriented towards the posterior pole (Figure 2a-d'). We conclude that Baz, Par6 and aPKC localize asymmetrically at the posterior apical cortex of SOPs prior to mitosis. By contrast, the Baz, Par6 and aPKC polarity vectors showed constant low magnitude and random direction in epi cells (Figure 2a-d'). This suggested that Baz, Par6 and aPKC localize in a non-polar manner in epi cells, consistent with their symmetric and non-oriented mode of division⁷. Thus, oriented planar asymmetry is established prior to mitosis in SOPs,

and only in SOPs.

Polarity vectors with low magnitude values and random direction, as seen in epi cells, were interpreted to suggest a non-polar distribution. Nevertheless, different magnitudes values were measured in epi cells for Baz-GFP (0.02), GFP-Baz (0.04), Par6-GFP (0.03) and aPKC-GFP (0.02). Importantly, these polarity values could result either from a weak and randomly oriented polarity (Figure 2e, bottom) or from stochastic intensity fluctuations, i.e. random (uncorrelated) patches (Figure 2e, top). Since analysis of intensity profiles along the cell cortex suggested that the distribution of GFP signal could be described as patches of higher intensity on top of a more or less uniform background, we sought to discriminate between these two possibilities by generating synthetic intensity profiles with randomly located patches but otherwise similar statistics to the actual cells, i.e. average number of patches per cell and distribution of patch intensities (Figure 2f). For epi cells, the average magnitude of the polarity vectors computed from these synthetic profiles was nearly identical to those measured for Baz, Par6 and aPKC (Figure 2a''-d''; compare the synthetic cell profiles (dashed lines) with the measured profiles in pale green). Thus, fluctuations alone could account for the differences in magnitude values. This showed that Baz, Par6 and aPKC are not planar polarized in epi cells.

For SOPs, the magnitude values measured experimentally for Baz, Par6 and aPKC were also very similar to those obtained from synthetic profiles at $t=-225$ (Figure 2a''-d''). Thus, a distribution in random patches could account for the measured values, indicating that Baz, Par6 and aPKC are not planar polarized at 13.5 hr APF. However, the magnitude values measured experimentally gradually deviated from synthetic profiles over time (Figure 2a''-d''). This allowed us to precisely stage the onset of planar polarization between $t=-175$ and $t=-125$ for all three polarity proteins. Thus, Baz, Par6 and aPKC become planar polarized in SOPs at the same time, suggesting that a common process may underlie planar polarization of these three proteins. While the agreement between synthetic and measured polarities at $t=-225$ may seem surprising for Baz (Figure 2a'',b'') given that the Baz polarity vector showed a posterior bias (Figure 2a',b'), a weak orientation is predicted to have only a small effect on the average magnitude (see Methods). Of note, the magnitude values calculated in synthetic cells appeared to significantly differ for these polarity proteins between SOPs and epi cells (Figure 2a''-d''), indicating that the anisotropic distribution of Baz, Par6 and aPKC into cortical patches differed between SOPs vs epi cells.

Our analysis so far indicated that the planar polarization of Baz, Par6 and aPKC is established prior to mitosis and in a concomitant manner for all three proteins in



Article Figure 2 – Concomitant onset of the planar polarization of Baz, Par6 and aPKC at interphase.

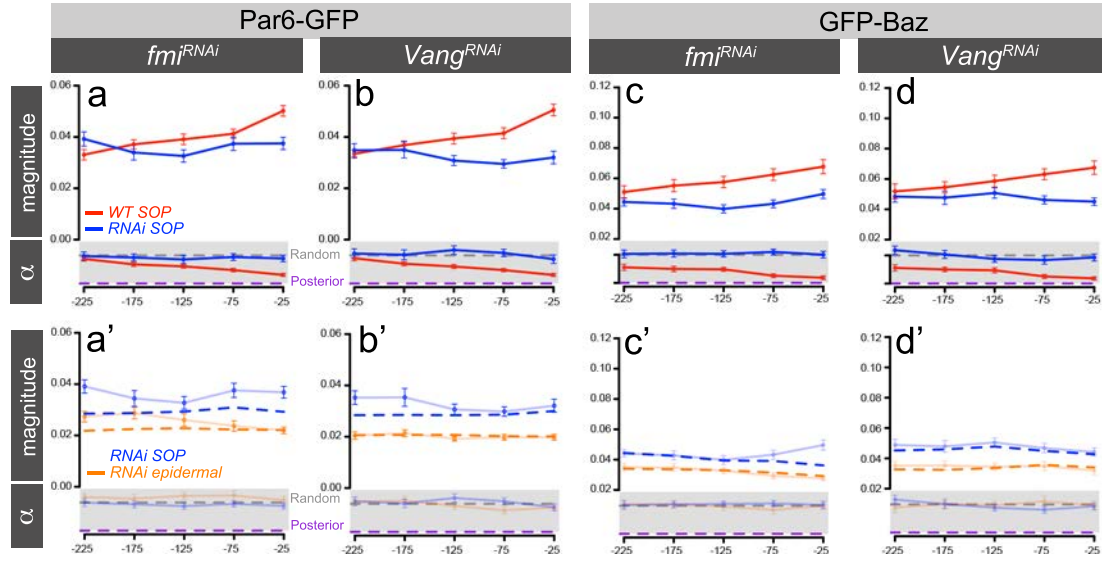
(a-d') Temporal profiles of the Baz-GFP (a,a'), GFP-Baz (b,b'), Par6-GFP (c,c') and aPKC-GFP (d,d') polarity vectors in SOPs (red) and epi cells (epi; green) from $t = -250$ min to mitosis ($t = 0$). The magnitude (top) and the direction (grey area, bottom) of the polarity vectors are shown. Two reference orientations are indicated: random orientation (grey dotted line) and stereotyped posterior orientation, i.e. $\pi/2$ angle (purple dotted line). Both raw data (a-d) and bootstrap mean (a'-d') profiles are shown. The number of cells studied here were: Baz-GFP, 44 SOPs and 42 epi; GFP-Baz: 50 SOPs and 47 epi; Par6-GFP: 83 SOPs and 78 epi; aPKC-GFP: 35 SOPs and 34 epi. The Baz-GFP, GFP-Baz and Par6-GFP profiles were measured in the absence of endogenous Baz and Par6, respectively. (a''-d'') The magnitude of the calculated Baz-GFP (a''), GFP-Baz (b''), Par6-GFP (c'') and aPKC-GFP (d'') polarity vectors (shown in transparent red for SOPs and green for epi; same profile as in a',b',c',d') are compared with the synthetic cell profiles (red and green dotted lines). This analysis revealed that Baz, Par6 and aPKC become planar polarized around $t = -125$ in SOPs. It also showed that cortical patches containing Baz, Par6 and/or aPKC remained randomly distributed in epi cells. (e) Positive magnitude values of non-oriented polarity vectors may result from the random distribution of cortical patches or from a randomly oriented but polarized distribution at the cell cortex. (f) workflow for the generation of the synthetic cell profiles. The length of the extracted cell contour was first normalized to 1 (right). High intensity patches were defined along this normalized contour (middle). The measured intensity and number (per cell) of these patches were scored. Synthetic cells were then created that had a similar distribution of cortical patches (in number of intensities) by drawing from this list.

SOPs but not in epi cells. The concomitant polarization of Baz, Par6 and aPKC in SOPs raised the possibility that the formation of Baz-Par6-aPKC oligomers underlies the planar polarization of SOPs. To test this idea, we investigated whether Baz, Par6 and aPKC were inter-dependent for their polar distribution in SOPs. Since mutant clones were small, lacked SOPs and/or altered the distribution of the other GFP-tagged markers (Figure S3), planar polarization was studied in heterozygous mutant background. This showed that the planar polarization of Par6 and Baz was dependent on Par6 levels and that the polarization of Par6 and aPKC was dependent on Baz levels (Figure S3). These cross-regulatory interactions supported the view that the formation of the Baz-Par6-aPKC complex underlies planar polarization in SOPs. Finally, to further test the role of active Par6-aPKC for the polarization of Par6, we studied the inhibition of Par6-aPKC by of Lethal(2) giant larvae (Lgl). At interphase, Lgl associates with Par6-aPKC, inhibits its activity and prevents the binding of Baz in SOPs. Upon phosphorylation of Par6 by AurA at mitosis, Lgl is dissociated from Par6-aPKC, allowing the formation of the Baz-Par6-aPKC complex²⁶. Here, we found that a reduction in Lgl levels, in heterozygous *lgl* mutant pupae, led to a slightly earlier and stronger planar polarization of Par6 (Figure S3). This observation further supports the notion that formation of an active Baz-Par6-aPKC complex underlies planar polarization.

Symmetry breaking by Planar Cell Polarity

We next investigated how this asymmetry is regulated in SOPs at interphase. Previous studies have indicated that the anterior Gai-Pins complex acts redundantly with planar cell polarity (PCP) proteins to restrict the Baz-Par6-aPKC complex posteriorly in mitotic SOPs^{13, 29, 30}. We therefore studied the potential role of Gai, Pins and PCP in the early polarization of SOPs prior to mitosis. We found that both the loss of *Gai* activity and the silencing of *pins* did not significantly affect the polarization of GFP-Baz and Par6-GFP (Figure S4). By contrast, the silencing of the PCP genes *Van Gogh* (*Vang^{mai}*) and *flamingo* (*fmi^{mai}*) not only randomized the direction of the Baz and Par6 polarity vectors but also abolished the increase in magnitude of the Baz and Par6 vectors (Figure 3a-d). The analysis of synthetic cells further showed that the silencing of *Vang* led to a complete loss of Baz and Par6 planar polarization while the silencing of *fmi* led to a very strong decrease (Figure 3a'-d'). Similarly, a loss of planar polarization was seen for Baz upon silencing of *frizzled* (*fz^{mai}*) (Figure S4). We therefore conclude that PCP is required for the initial planar polarization of Baz and Par6 in SOPs.

While PCP is required for the initial symmetry-breaking input, the silencing of *Vang^{mai}* and *fmi^{mai}* had only a minor effect on the asymmetric distribution of GFP-Baz



Article Figure 3 – PCP is required for the asymmetric planar distribution of Baz and Par6 in SOPs

(a-d) The temporal profiles of the Par6-GFP (a,b) and GFP-Baz (c,d) polarity vectors measured in *fmi^{RNAi}* (a,c) or *Vang^{RNAi}* (b,d) SOPs (blue) are compared to the corresponding wild-type profiles (as shown in Figure 2b',c'). (a'-d') The magnitude of the Par6 and GFP-Baz polarity vectors (SOPs, transparent blue; same profile as in a-d) is compared with those from the synthetic cell profiles (blue dotted line). The magnitude of polarity vectors measured in epi cells (transparent orange) is also compared with those from the synthetic cell profiles (orange dotted line). Of note, the magnitude values calculated in synthetic cells still differed between SOPs and epi cells, indicating that the difference in Baz and Par6 distribution in SOPs vs epi cells does not depend on PCP. These temporal profiles were measured using 32 SOPs and 32 epi (GFP-Baz in *fmi^{RNAi}*); 41 SOPs and 33 epi (GFP-Baz in *Vang^{RNAi}*); 24 SOPs and 27 epi (Par6-GFP in *fmi^{RNAi}*); 25 SOPs and 24 epi (Par6-GFP in *Vang^{RNAi}*).

at mitosis (Figure S5). This confirmed that the loss of PCP did not disrupt asymmetry at division but only randomized the planar orientation of this asymmetry^{7, 13}. We therefore suggest that a back-up mechanism can operate at mitosis to create asymmetry when it fails to be established prior to mitosis upon loss of PCP. This PCP-independent symmetry breaking mechanism is referred to here as "mitosis rescue" (see discussion). Thus, we propose that PCP is required to establish planar asymmetry prior to mitosis and that, in the absence of PCP, asymmetry can be established upon mitotic entry, albeit less efficiently and in a non-oriented manner, by a "mitosis rescue" mechanism.

Crumbs inhibits the polarization of Par6 and Baz

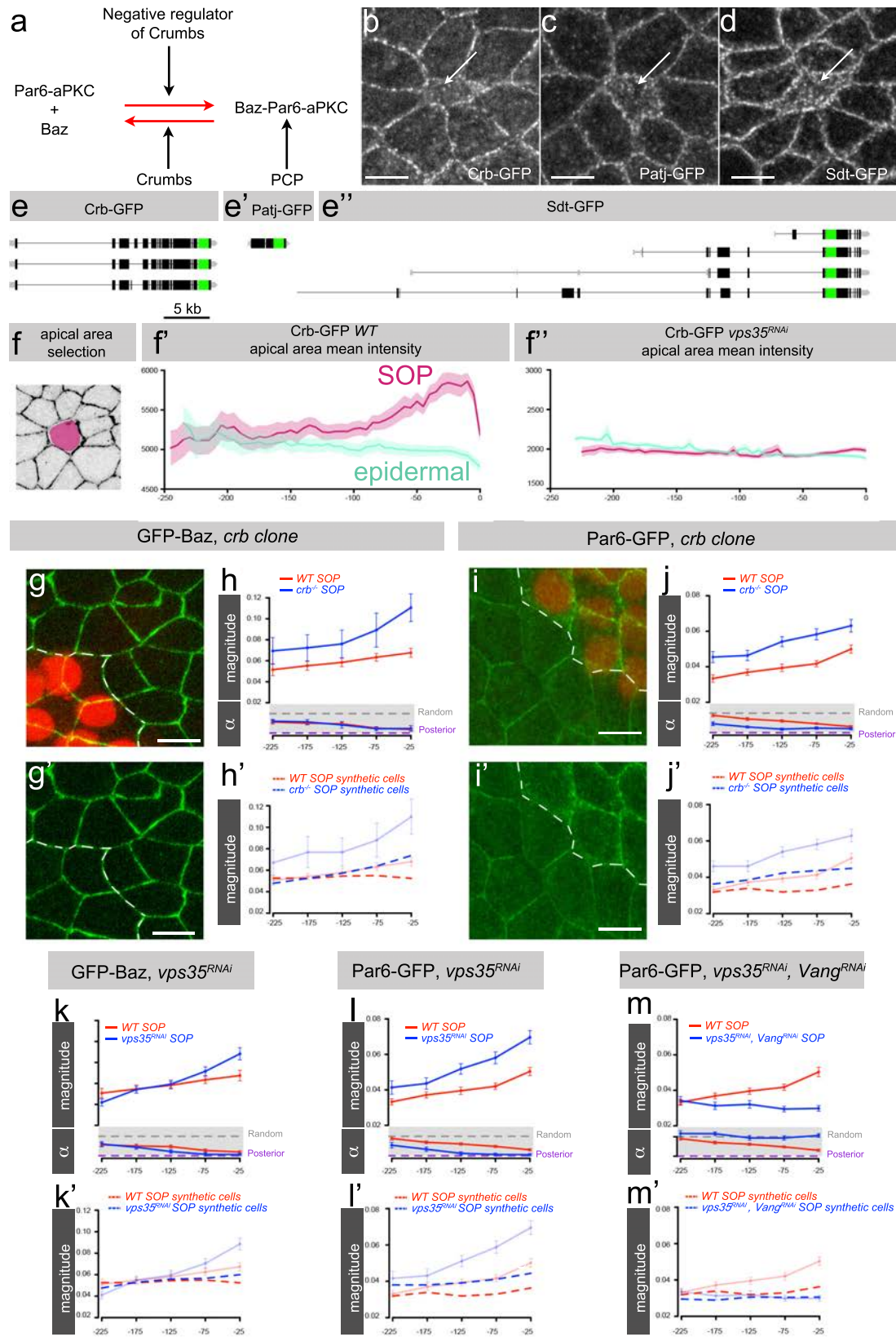
PCP operates across the whole notum epithelium to polarize all cells of the notum^{14, 15}. Yet, symmetry breaking by PCP was only seen in SOPs. Thus, mechanisms restricting to SOPs the interpretation of the PCP signal for the planar polarization of the Baz-Par6-aPKC complex must exist. Assuming that the formation of the Baz-Par6-aPKC complex is a pre-requisite for its polarization by PCP, and since Crb can antagonize the Baz-Par6-

aPKC complex via its interaction with Par6¹⁸⁻²², we wondered whether the activity of Crb could be down-regulated in SOPs to allow formation of this complex specifically in SOPs (Figure 4a). To test this hypothesis, we first looked at the distribution of Crb using a Crb-GFP knock-in line³¹. Crb-GFP was primarily found at cell-cell contacts in epi cells but was also detected at the apical surface of SOPs in 16.5 APF pupae (Figure 4b,e). Quantitative live imaging indicated that the SOP-specific accumulation of Crb-GFP at the apical surface was concomitant to the planar polarization of Baz, Par6 and aPKC (Figure 4f,f'). A similar SOP-specific accumulation was also observed for Stardust (Sdt; Pals1 in mammals)³² and Patj^{33, 34}, two members of the Crb complex, using GFP-tagged proteins (Figure 4c,d,e',e''); BAC-encoded Patj-GFP and Sdt-GFP were generated in this study and shown to be functional using a genomic rescue assay; see Methods). Thus, the distribution of the Crb complex is specifically regulated in SOPs prior to mitosis.

We next tested whether Crb inhibits the planar polarization of SOPs. In *crb* mutant cells, the Baz and Par6 polarity vectors exhibited higher magnitude values (Figure 4g-h and i-j). Additionally, the Par6 vector was oriented towards the posteriorly earlier than in wild-type control (Figure 4j). Analysis of synthetic cells confirmed that the planar

Article Figure 4 (facing page) – Crb antagonizes the planar polarization of Baz and Par6 in SOPs.

(a) working hypothesis: considering that Crb inhibits the formation of the Baz-Par6-aPKC complex, we hypothesize that negative regulators of Crb might act in SOPs to promote the formation of this complex. PCP would regulate the asymmetric accumulation of this complex. (b-d) Crb-GFP (b), Patj-GFP (c) and Sdt-GFP (d) accumulated at the apical surface of SOPs. Arrows indicate SOPs (identified using neur-H2B-RFP; not shown). Scale bar = 5 μ m. (e-e'') representation of the Crb-GFP (e), Patj-GFP (e') and Sdt-GFP (e'') genomic regions (as in Figure 1). Crb-GFP is a knock-in construct. Patj-GFP and Sdt-GFP are BAC-encoded constructs. All Sdt isoforms are tagged by GFP (not all isoforms are shown). (f-f'') The apical area (pink) was defined following z-projection and extraction of the cell contour (f). The mean intensity of the Crb-GFP signal over this apical area was measured over time in selected SOPs (pink; n=23) and epi cells (light blue; n=23) and plotted (t=0 corresponds to mitosis). The temporal profiles of apical area Crb-GFP intensity of control and *vps35^{RNAi}* pupae are shown (f',f''); *vps35^{RNAi}*: 27 SOPs and 27 epi). An increased apical accumulation of Crb was detected in SOPs but not in epi cells. The activity of *vps35* was required for this SOP-specific increase. (g,g') distribution of GFP-Baz (green) in *crb* mutant clones marked by the absence of nlsRFP (red). (h,h') measured (h) and synthetic cell (h') profiles of the GFP-Baz polarity vector in *crb* mutant SOPs (blue; n=13) compared to the corresponding wild-type profile (red; as shown in Figure 2b'). An increased polarization of Baz was observed in *crb* mutant SOPs. (i,i') distribution of Par6-GFP (green) in *crb* mutant clones marked by the absence of nlsRFP (red). Loss of Crb led to reduced levels of cortical Par6-GFP. (j,j') measured (j) and synthetic cell (j') profiles of the Par6-GFP polarity vector in *crb* mutant SOPs (blue; n=56) compared to the corresponding wild-type profile (red; as shown in Figure 2c'). Increased polarization of Par6 was observed in *crb* mutant SOPs. (k-m') measured (k,l,m) and synthetic cell (k',l',m') profiles of the GFP-Baz (k,k') and Par6-GFP (l-m') polarity vectors in *vps35^{RNAi}* (k-l'; GFP-Baz, n=42; Par6-GFP, n=32) and *vps35^{RNAi} Vang^{RNAi}* (m,m'; Par6-GFP, n=32) SOPs (blue) compared to the corresponding wild-type profile (red; as shown in Figure 2b',c'). *Vps35* appeared to antagonize the planar polarization of Baz and Par6 (k-l'). The increased polarization of Par6 in *vps35^{RNAi}* pupae appeared to be *Vang*-dependent (l-m'). Scale bars are 5 μ m.

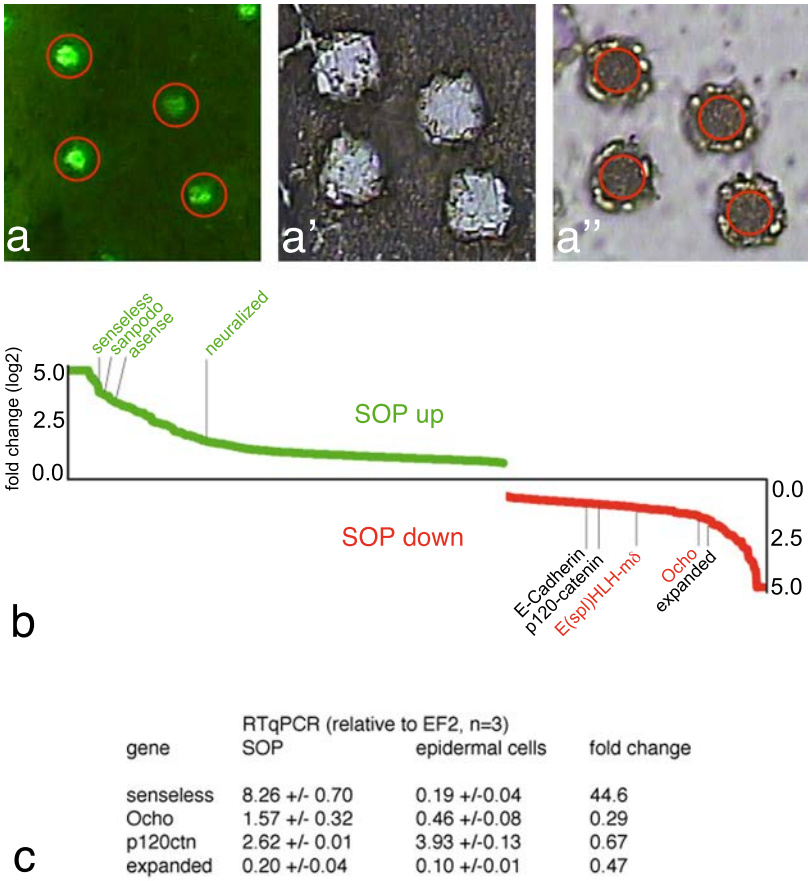


polarization of Baz and Par6 was increased in *crb* mutant cells (Figure 4h',j'). Moreover, the polarization of Par6 was enhanced upon the silencing of *sdt*, which resulted in low Crb levels (Figure S4). We therefore conclude that Crb prevents the early planar polarization of Baz and Par6. One possible interpretation is that Crb limits the amount of Par6 that can interact with Baz. Consistent with the idea that Par6 is limiting for the formation of Baz-Par6-aPKC complexes in SOPs, reducing the gene dosage of Par6 decreased the planar polarization of Par6 and Baz (Figure S3).

Previous studies have shown that the retromer regulates the endosomal sorting of Crb. Crb binds to Vps35, a cargo recognition subunit of the retromer, and silencing of the *vps35* gene led to reduced Crb levels in follicular cells^{35, 36}. Here, we found that the silencing of the *vps35* not only led to reduced Crb-GFP levels in all notum cells but also inhibited the apical accumulation of Crb-GFP in SOPs (Figure 4f',f'). This suggested that the apical accumulation of Crb might involve a retromer-mediated re-localization of Crb from the marginal zone to the apical free surface. The silencing of *vps35* also resulted in the increased polarization of Baz and Par6 (Figure 4k-I') but this polarization remained dependent on PCP (Figure 4m,m'). We conclude that the distribution and activity of Crb is regulated in SOPs by a retromer-dependent process and propose that Crb acts as a brake to prevent the early polarization of Baz and Par6 in SOPs. We suggest a model whereby Crb interacts with Par6-aPKC to prevent planar polarization in epi cells whereby a SOP-specific regulation of Crb distribution would favor the release of Par6-aPKC at the apical marginal zone, thereby promoting the formation of the Baz-Par6-aPKC complex.

Expression profiling of SOPs

To gain insights into the SOP-specific regulation of Crb, expression profiling was performed to identify genes that are differentially expressed between SOPs and epi cells. We used Laser Capture Microdissection (LCM) to isolate individual SOPs and epi cells from 16-17 hr APF dissected nota (Figure 5a-a'')³⁷. Duplicates of approximately 300 SOPs (or epi cells) were studied by deep sequencing of the corresponding reverse transcribed and PCR-amplified RNAs (see Methods): 7860 and 7888 genes were expressed in SOPs and epi cells, respectively (mean number of reads ≥ 50). Of those, 576 were differentially expressed (362 higher and 214 lower in SOPs; Figure 5b and Table S2). This LCM/RNAseq approach successfully identified all known SOP-specific genes^{38, 39}, e.g. *senseless*, *santopodo*, *asense* and *neutralized*, as well as some Notch target genes, e.g. *E(spl)mδ-HLH* and *Ocho*, that are predicted to be repressed in SOPs⁴⁰. Amongst the genes expressed at lower levels in SOPs, we identified one known regulator of Crb, i.e. the FERM domain protein Expanded (Ex) that directly interacts with the short intracellular tail of Crb^{41, 42, 43}.



Article Figure 5 – RNA profiling of SOPs

(a-a'') Micrographs of a dissected notum prior to (a) and after (a') LCM and the GFP-positive SOPs (green) prior to (a) and after (a'') LCM. (b) Plot according to fold change of the 576 genes that were differentially expressed between SOPs and epi. Genes up- and down-regulated in SOPs are shown in green and red, respectively. (c) Expression analysis of selected genes by RT-qPCR showing the lower levels of *p120ctn* and *ex* transcripts in SOPs. The SOP-specific gene *senseless* and the Notch target gene *Ocho* were used as positive controls for up- and down-regulated genes, respectively.

We also identified E-Cadherin (E-Cad) and the E-Cad associated protein p120ctn. The p120ctn protein is a core AJ component that binds the juxtamembrane region of E-Cad. While p120ctn is not an essential AJ component, genetic studies have shown that it is a positive modulator of E-Cad-based adhesion⁴⁴. Thus, our gene profiling results raised the possibility that AJ dynamics and/or adhesion may differ between SOPs and epi cells. RTqPCR on PCR-amplified replicates of RNAs from LCM-purified SOPs and epi cells confirmed that SOPs had lower levels of *ex* and *p120ctn* transcripts (Figure 5c). We therefore decided to study here the function of p120ctn and Ex in the regulation of AJ and Crb dynamics, respectively.

A p120ctn-regulated remodeling of AJs in SOPs

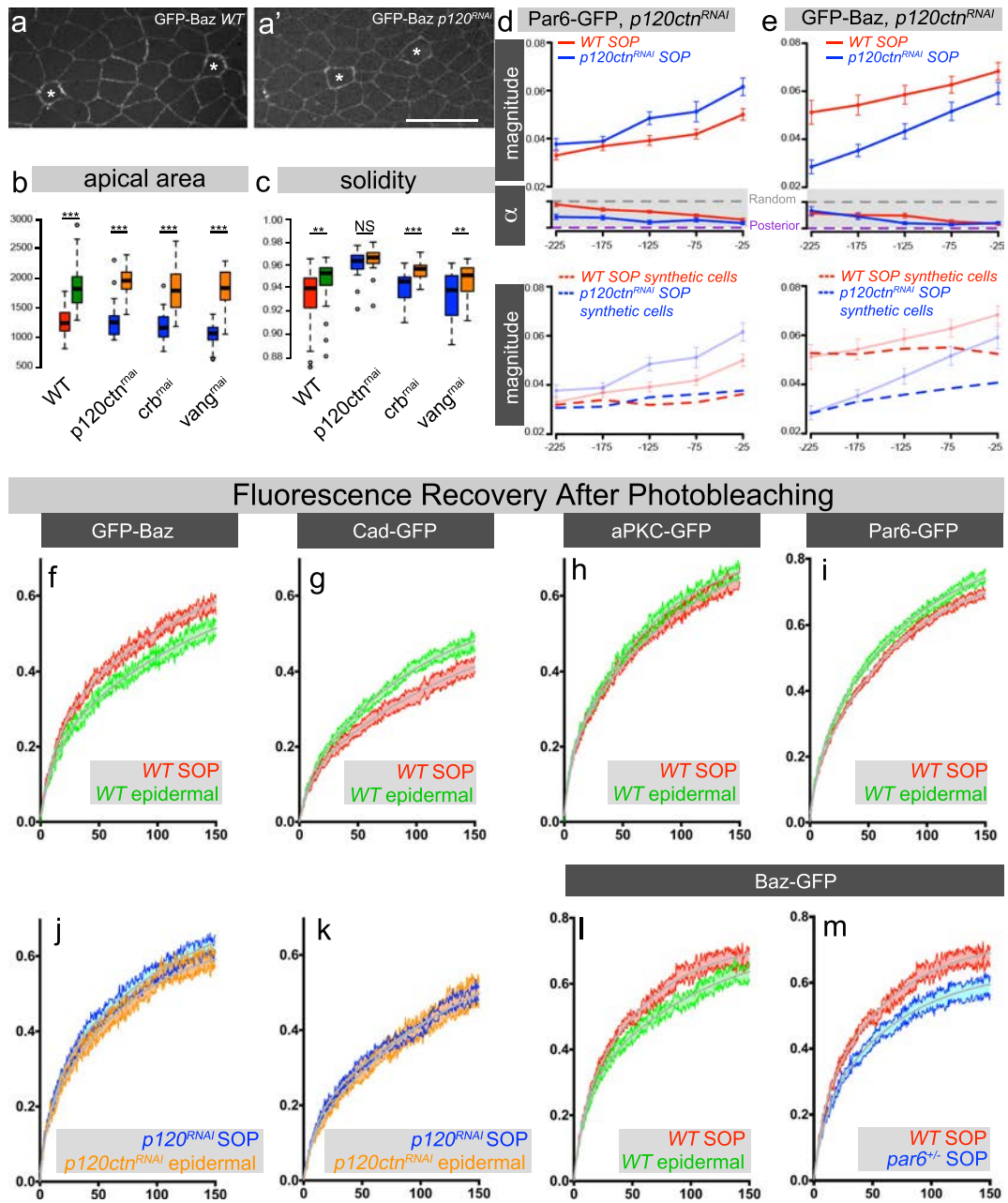
To investigate possible differences in AJ regulation between SOPs and epi cells, we first studied the size and shape of these cells using the cell contours from the GFP-Baz movies (Figure 6a). SOPs were found to have a smaller surface area than epi cells (Figure 6b). This difference was, however, not affected by the silencing of the *p120ctn*, *crb* and *Vang* genes. Using "solidity" as a shape descriptor (solidity is the ratio between actual and convex hull area; it measures the extent to which the apical area is convex), we found that SOPs were less solid than epi cells and that this difference was *p120ctn*-dependent (Figure 6a',c). By contrast, reduced PCP and Crb activities did not affect solidity. This suggested that AJ-mediated cell-cell adhesion might depend on p120ctn levels.

To further test AJ dynamics in SOPs and epi cells, we performed Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) experiments in the notum of 16 hr APF Cad-GFP pupae (Cad-GFP is a functional protein from a knock-in line³¹). Analysis of the recovery profiles measured in SOPs and epi cells indicated that the mobile fraction of Cad-GFP was lower in SOPs than in epi cells. This difference was abolished in *p120ctn^{RNAi}* pupae (Figure 6g,k). This indicated that a p120ctn-dependent regulation of AJ dynamics occurs in SOPs.

To test the significance of this p120ctn-mediated regulation of AJs for the planar polarization of SOPs, we studied the polarized distribution of Par6 and Baz in *p120ctn^{RNAi}* SOPs. First, the planar polarization of Par6-GFP developed earlier and was stronger than in control SOPs (Figure 6d). Second, analysis of the measured magnitude profile relative to those calculated in synthetic cells indicated that the planar polarization of GFP-Baz

Article Figure 6 (facing page) – p120ctn-regulated AJ remodeling

(a,a') shape of notum cells at the level of their apical cortex in control (a) and *p120ctn^{RNAi}* 13 hr APF pupae expressing GFP-Baz. SOPs are indicated with asterisks. Scale bar = 20 μ m. (b,c) Box plots showing the distribution of apical area (b) and solidity (c) values in control SOPs (red) and epi (green) as well as upon *crb^{RNAi}*, *Vang^{RNAi}* and *p120ctn^{RNAi}* RNAi-mediated gene silencing (SOPs, blue; epi, orange). Statistical significance: **, $p < 0.001$ and ***, $p < 0.0001$. (d,e) measured and synthetic cell profiles of the Par6-GFP (d) and GFP-Baz (e) polarity vectors in *p120ctn^{RNAi}* SOPs (blue; Par6-GFP, $n=44$; GFP-Baz, $n=28$) compared to the corresponding wild-type profile (red; as shown in Figure 2b',c'). (f-m) FRAP profiles were determined over a 150s recovery period in control SOPs (red) and epi (red) of GFP-Baz (f; 28 SOPs and 27 epi), Cad-GFP (g; 25 SOPs and 22 epi), aPKC-GFP (h; 25 SOPs and 26 epi), Par6-GFP (i; 48 SOPs and 40 epi), Baz-GFP (l; 30 SOPs and 31 epi). The GFP-Baz (j; 32 SOPs and 32 epi) and Cad-GFP (k; 19 SOPs and 20 epi) FRAP profiles were also measured in *p120ctn^{RNAi}* SOPs (blue) and epi (orange). The Baz-GFP profile measured in par-6 heterozygous SOPs (blue in m; $n=34$) was compared to the corresponding control (red in m; same as in l). Intensities were normalized by pre-bleach intensity of the junction. Error bars represent the standard error to the mean. The grey line is the fitted function.



was also increased in *p120ctn^{RNAi}* SOPs (Figure 6e). We also noticed that the silencing of *p120ctn* led to a more even distribution of GFP-Baz at the cell cortex, as shown by the low magnitude values of the *p120ctn^{RNAi}* synthetic SOPs. We therefore conclude that p120ctn antagonizes the planar polarization of Baz and Par6 in SOPs. This in turn suggests that decreased levels of p120ctn in SOPs may contribute to their planar polarization.

We next wondered whether this proposed p120ctn-regulated remodeling of AJs in SOPs might affect the dynamics of Baz, Par6 and/or aPKC. We first studied GFP-Baz and Baz-GFP by FRAP in 16 hr APF pupae. In both cases, the fraction of mobile Baz appeared to be higher in SOPs than in epi cells. The inverse correlation in the mobility of Baz and E-Cad seen here confirmed earlier findings²⁵. We next investigated the role of p120ctn. Similar recovery profiles were observed in SOPs and epi cells in *p120ctn^{RNAi}* pupae. Thus, p120ctn regulates both AJ dynamics and Baz mobility. We interpret these data to suggest that a p120ctn-dependent remodeling of AJs occurs specifically in SOPs and that this remodeling increases the pool of mobile Baz. This SOP-specific regulation might specifically affect the dynamics of Baz since Par6-GFP and aPKC-GFP showed similar recovery profiles in SOPs and epi cells (Figure 6h,i). One possible interpretation is that the mobile pool of Baz corresponds to the fraction of Baz that associates with Par6-aPKC in SOPs whereas the pool of Baz localizing at AJs would be less mobile. In support of this interpretation, we found that the fraction of mobile Baz-GFP is decreased upon reducing the level of Par6 in *par-6* heterozygous pupae (Figure 6m), possibly due to the reduced amounts of Baz-Par6-aPKC complexes. Thus, we propose that the SOP-specific increase in Baz mobility reflects the formation of the Baz-Par6-aPKC complex. Accordingly, the SOP-specific decrease in p120ctn levels might favor the release of Baz from AJs, thereby favoring the formation of a Baz-Par6-aPKC complex.

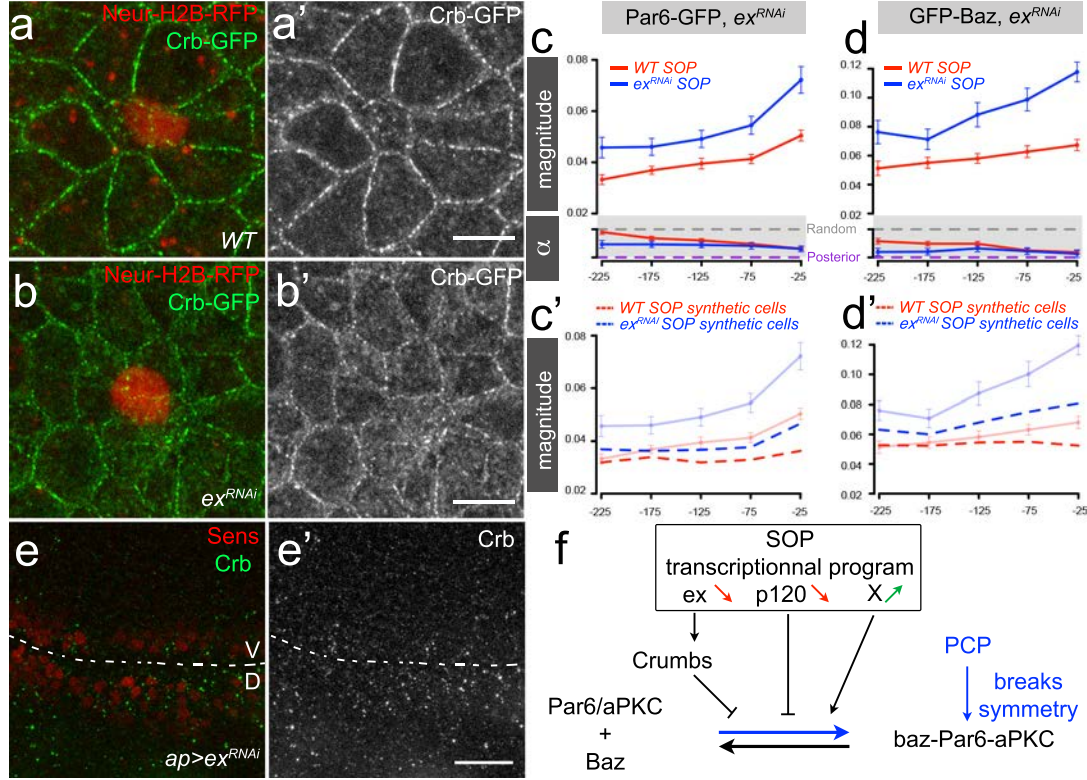
Ex regulates Crb endocytosis and Par6 planar polarization

We next investigated the role of Ex in regulating the activity of Crb. Previous studies have indicated that Ex localizes at the apical cell cortex and directly interacts with the conserved FERM-binding motif (FBM) of Crb^{41, 42, 43}. This interaction may be important to stabilize Crb at the plasma membrane by linking Crb to the cortical actin cytoskeleton and/or by antagonizing its endocytosis. Here, we showed that the silencing of the *ex* gene led to a more diffuse distribution of Crb-GFP in the notum (Figure 7a-b'), supporting the notion that Ex stabilizes Crb at the apical membrane. To test whether Ex regulates the endocytosis of Crb, we used an antibody uptake assay to monitor the internalization of GFP-Crb, a knock-in version of Crb fused extracellularly with GFP³¹. This endocytosis assay was performed on *ap>ex^{RNAi}* wing imaginal discs in which the expression of *ex* was

specifically silenced in dorsal cells. Higher levels of internalized Crb (iCrb) was detected as basal punctae in dorsal cells (Figure 7e,e'), indicating that the silencing of *ex* led to increased endocytosis of Crb. We conclude that Ex antagonizes the endocytosis of Crb. We then studied the effect of Ex on the planar polarization of SOPs. Analysis of the GFP-Baz and Par6-GFP polarity vectors showed an earlier and increased polarization of both Baz and Par6 in *ex^{RNAi}* SOPs relative to wild-type SOPs (Figure 7c,c'). This indicated that Ex antagonized the planar polarization of Baz and Par6. Since Ex stabilizes Crb and since Crb limits the amount of Par6 that can interact with Baz, we suggest that low Ex levels in SOPs might contribute to down-regulate Crb and thereby favor the release of Par6 from Crb.

Ex is also known to act as a positive regulator of Hippo signaling^{41, 42, 43, 45-48}. In this context, Crb interacts with Ex in a complex with Merlin (Mer), another FERM-domain protein, and Kibra to recruit the Hippo-Warts (Wts) kinase complex and to regulate its activity. To test whether Ex might act via a Kibra-Hippo-Wts pathway to limit the planar polarization of Par6, we studied Par6-GFP in *kibra^{RNAi}*, *hippo^{RNAi}* and *wts^{RNAi}* pupae. We found that the planar polarization of Par6 in *kibra^{RNAi}* and *wts^{RNAi}* pupae was similar to those seen in controls (Figure S6), indicating that Crb and Ex are unlikely to regulate the planar polarization of Par6 via Wts. Also, while the planar polarization of Par6 appeared to develop earlier in *hippo^{RNAi}* pupae, we noticed that the subcellular distribution of Par6 was significantly altered in this genetic background (Figure S6). Whatever the basis and significance of this regulation of Par6 by Hippo, this phenotype is distinct from the one seen in *ex^{RNAi}*, *crb^{RNAi}*, *vps35^{RNAi}* and *sdt^{RNAi}* pupae. Thus, we conclude that Ex likely regulates the polarization of Par6 via the regulated trafficking of Crb and not via Hippo-Wts signaling. Together, our data indicate that Ex negatively regulates the endocytosis of Crb and prevents the early polarization of Baz and Par6 in SOPs. Thus, we suggest a model whereby low Ex activity in SOPs favors the endocytosis of Crb and thereby favors the release of Par6 and formation of a Baz-Par6-aPKC complex.

In summary, our results indicated that, upon SOP specification, changes in gene transcription contribute to epithelial polarity remodeling and formation of a Baz-Par6-aPKC complex that would receive a localized input from PCP, leading to its planar polarization and asymmetric cell division.



Article Figure 7 – Expanded prevents Crumbs internalisation, hence polarisation

(a-b') Distribution of Crb-GFP (anti-GFP, green) in control (a,a') and *ex^{RNAi}* (b,b') 13 hr APF pupae. SOPs were marked by Sens (red). (c-d') measured (c,d) and synthetic cell (c',d') profiles of the Par6-GFP (c,c') and GFP-Baz (d,d') polarity vectors in *ex^{RNAi}* SOPs (blue; Par6-GFP, n=26; GFP-Baz, n=24) compared to the corresponding wild-type profile (red; as shown in Figure 2b',c'). (e-e') anti-GFP (green) antibody uptake assay in *ap>ex^{RNAi}* wing disc expressing GFP-Crb. Sens (red) indicates the DV boundary. A higher level of antibody uptake was detected in the dorsal cells that are silenced for the *ex* gene relative to the control ventral cells in n=3/15 discs (in other discs, no significant uptake was detected). (f) A model for the planar polarization of SOPs. Following determination, SOPs express a specific transcriptional program that results in a p120ctn-regulated AJ remodeling and an *ex*-regulated redistribution of Crb. This SOP-specific regulation may promote the release of Par6-aPKC (from Crb) and of Baz (from E-Cad), thereby favoring the formation in SOPs of the Baz-Par6-aPKC complex at the interface of AJs and of the apical marginal zone. The Baz-Par6-aPKC complex might receive the symmetry breaking input from the PCP. Additional genes that are up- or down regulated in SOPs (X) may also participate in these regulatory processes.

Discussion

Our study links a cell-specific transcriptional program to asymmetric cell division in an epithelial cell. Specifically, we propose that i) SOP specification is associated with changes in gene expression that affect its polarized organization; ii) in particular, reduced p120ctn levels affect AJ dynamics and adhesion, which may favor the release of Baz from AJs; iii) in parallel, reduced Ex levels result in the re-distribution of Crb away from the apical marginal zone, which may promote the release of Par6-aPKC from Crb; iv) the proposed release of Baz and Par6-aPKC would lead to the formation of the Baz-Par6-aPKC complex; v) this complex, but not its individual components, would be competent to receive a localized input from PCP, leading to the planar polarization of the Baz-Par6-aPKC complex at the posterior cortex of SOPs prior to mitosis. In this model, the transcriptionally driven SOP-specific remodeling of epithelial polarity would relieve the inhibitory influence of junctions on asymmetric cell division in epithelial cells by allowing the formation of the Baz-Par6-aPKC complex. A key assumption of this model is that this complex is an output of the PCP activity in this tissue, thereby explaining how SOPs, but no other cells in this epithelium, respond to PCP.

The first two major findings of this study are the initial and concomitant planar polarization of Baz, Par6 and aPKC at the cortex of SOPs prior to mitosis and the identification of PCP as the initial symmetry breaking input. Both findings were made possible by combining genomic engineering, live imaging, image processing and modeling. Indeed, the onset of planar polarization could only be observed clearly by comparing the measured intensity profiles with those generated by synthetic cells. Since planar polarization takes place during interphase, mitotic kinases are not involved in the early polarization of SOPs. They may, however, amplify this initial asymmetry at mitosis. Consistent with this view, Lgl was shown here to inhibit the planar polarization of Par6 in SOPs prior to mitosis and phosphorylation of Par6 by the mitotic kinase AuroraA contributes to relieve the inhibition exerted by Lgl upon mitotic entr²⁶.

A main issue, however, remains: how does PCP regulate the distribution of the Baz-Par6-aPKC complex? A simple model would be that PCP proteins located and/or active at the posterior cortex, e.g. Fz²⁹, recruits the Baz-Par6-aPKC complex or, conversely, that PCP proteins located and/or active at the anterior cortex, e.g. Vang²⁹, excludes this complex. Of note, Baz was reported to directly interact with Fmi⁴⁹ and increased Fmi protein levels were observed in SOPs⁵⁰. Whether this interaction is required for Baz polarization remains to be studied. More indirect models may also be considered⁵¹.

Although PCP is necessary for the initial planar polarization of SOPs, it is not essential for asymmetry at mitosis. This indicates that early defects in SOP polarization can be rescued at mitosis in SOPs. A similar phenomenon was observed in neuroblasts⁵²: while a microtubule-dependent orientation cue normally persists from mothers to daughters to position the division axis, upon loss of this cue, asymmetry can form de novo at mitosis but randomly relative to the previous division axis. Also, while the molecular basis of this "mitosis rescue" is unknown, we previously showed that Pins acts redundantly with Fz to localize Baz asymmetrically in dividing SOPs¹⁶, indicating that "mitosis rescue" might involve Pins. Since Pins is a target of the mitotic kinase AurA and that phosphorylation of Pins is important for its recruitment at the cortex by Discs-large^{16, 53}, we suggest that "mitosis rescue" could be triggered by mitotic kinases via the phosphorylation of Pins.

Another major finding of this study is that the interplay between the Crb and Baz-Par6-aPKC complex may be subjected to a SOP-specific regulation. Indeed, the distribution of the Crb complex specifically changed in SOPs, with lower levels at the apical marginal zone and higher levels at the apical surface. This change was concomitant to the planar polarization of the Baz-Par6-aPKC complex. Since Crb, Sdt, Ex and Vps35 appeared to similarly prevent the early polarization of Par6 and Baz in SOPs, we propose that a SOP-specific down-regulation of Crb at the apical marginal zone, associated with increased trafficking of Crb due to lower levels of Ex, may favor the release of Par6-aPKC from Crb. Increasing free Par6-aPKC would therefore promote the formation of the Baz-Par6-aPKC complex.

Finally, AJ dynamics and cell adhesion were shown to differ between SOPs and epi cells. Specifically, a p120ctn-dependent regulation of AJs contributed to clear differences in the mobility of E-Cad and in the geometry of cell-cell contacts. Again, we correlated these SOP-specific changes with the decreased expression of the *p120ctn* gene in SOPs. We propose that this AJ remodeling may favor the release of Baz, hence the formation and planar polarization of the Baz-Par6-aPKC complex.

Importantly, Ex and p120ctn are unlikely to be the only regulators that are differentially expressed in SOPs and that are involved in these SOP-specific polarity changes. Indeed, additional known and potential AJ regulators identified by gene profiling may also contribute to this process. Finally, we speculate here that it is equally important to partially down-regulate Crb and AJs for the release of Par6-aPKC and Baz, respectively, and to nevertheless keep functional junctions so that SOPs remained anchored within the epithelium, allowing PCP to operate and orient division along the a-p axis. This balance

may be essential to build fully functional, i.e. properly oriented, sensory organs at the body surface.

In conclusion, our model reconciles two key observations. First, many asymmetrically dividing cells have no junctions¹ and apical cell-cell junctions appeared to inhibit asymmetric division in epithelial cells⁶. Second, asymmetric divisions have been reported in epithelia of various model organisms, including epithelial seam cells in *C. elegans*, follicular stem cells in *Drosophila* and limbal epithelial stem cell in the cornea in mammals. Thus, our model provides a general framework to understand how epithelial cells can divide asymmetrically.

Methods

Transgenes

Baz-GFP: the BAC CH321-57K08⁵⁴ was deleted of 30.829 nt 3' to the *baz* gene using recombineering in *E. coli* using the following primers:

bazD3'parttrpsL-F:

ATGCCGAATACCGAGTTGCGAATTAAACGTTAAAAATTTTggcctggtgatgatggcggg

bazD3'partneoR:

CTTTACTTCTGTCAAGTTGATGTGTTGCATTTCTGCATTTtcagaagaactcgtcaagaa

bazD3'part-F:

ATGCCGAATACCGAGTTGCGAATTAAACGTTAAAAATTTTAAATGCAGAAATGCAA
CACATCAACTTGACAGAAGTAAAG

GFP was then inserted within the Baz ORF using the following primers:

bazrpsL2-F:

ACGGGAGCAGAGCAGTGGCGGCATACCCGCCACCTGCTGggcctggtgatgatggcgggatcggtg

bazneo2-R:

TGGGCTGCTGCTGCTGGAGTTGCTGCTGCTGATGTTGCTGtcagaagaactcgtcaagaaggcgatag

bazsfGfp2-F:

AGCAGAGCAGTGGCGGCATACCCGCCACCTGCTGggtgttggcatggtgtccaagggcgagga

bazsfGfp2-R:

TGCTGCTGCTGGAGTTGCTGCTGCTGATGTTGCTGacccacgccgatcccttgtagctcat

aPKC-GFP: the BAC CH321-09G4⁵⁴ was deleted of nnnn nt 5' to the *apkc* gene using the following primers:

aPKC5'part rpsl-F:

ttgcattttcctcctacgagctttataccgctcctccaaaggcctggtgatgatggcggg

aPKC5'part neo-R:

TTGTTTAATTTTATTTATGTATGCAGCTAAAAACTTTGCCtcagaagaactcgtcaagaa

aPKC5'part-F:

ttgcattttcctcctacgagctttataccgctcctccaaaGGCAAAGTTTTTAGCTGCATACATAAAT
AAAATTAAACAA

GFP was then inserted within the aPKC ORF using the following primers:

aPKCrpsl-F:

CCGCCACTTCCCTACGAAGCGATGAGCGGCggcctggtgatgatggcggg

aPKCneo-R:

ATGGTCGTGCGTCTCGCAGGCTTCGGCTCCtcagaagaactcgtcaagaaggc

aPKCgfp-F:

CCGCCACTTCCCTACGAAGCGATGAGCGGCgtgggaatggtgagcaagggcgaggagc

aPKCgfp-R:

ATGGTCGTGCGTCTCGCAGGCTTCGGCTCCaacacccttgtagctcgtccatgccg

The resulting BACs were verified by sequencing of the recombined regions prior to phiC31-mediated integration at the P{CaryP}attP18 (Baz-GFP at position 6C2) and PB{y+attP-3B}VK38 (aPKC-GFP at position 5B8) attP sites. Transgenesis was performed by BestGene Inc (Chinmo, USA). Genomic rescue assays showed that these BACs encode functional versions of the *baz* and *aPKC* genes. Specifically, *baz815.8* / *Y* males carrying one copy of the Baz-GFP BAC were viable and fertile.

Flies

Nearly all live imaging and FRAP experiments were performed in rescued contexts, i.e. in the complete absence of endogenous Par6 or Baz. All genotypes are detailed in Table S1.

Live imaging

5D (x,y,z,c,t) movies were acquired using the Metamorph software on an upright Leica DMRXA microscope equipped with a CSU-X1 spinning disk, a back-illuminated Quantem 512C camera, 491 and 561 lasers, and a 63x (HCX PL APO CS, N.A. 1.3) objective. Live imaging of staged pupae was performed at 20+/-2°C. Pupae were mounted after head eversion. Movies started at 13.5 hr APF and were stopped when all SOPs had divided (around 17.5h APF). Δz was 0.5 Δm and Δt was 5 mn. Only SOPs from row 1 were analyzed. Epi cells selected for analysis were i) close to row 1, ii) had no contact (junction or vertex) with SOPs and iii) divided around the same time as SOPs. The reference t=0 (mitosis) was defined by cell rounding. Exact time values are given, i.e. timing was not corrected to the 25°Cdevelopmental timing standard.

Image analysis: the planar polarization vector

Starting from (x,y,z,t,c) movie files, (x,y,t) movies were generated by the maximal projection of 4-6 apical planes in the GFP channel. SOPs located in the most medial microchaete row of the dorso-central region (row 1) and epi cells that were both not in direct contact with SOPs and away from the midline were then selected for Snake analysis using the FIJI plugin "JFilament" (<http://athena.physics.lehigh.edu/jfilament/>). Each Snake was visually inspected and manually corrected if needed. Snakes were configured such as

to form discontinuous polygons with each vertex separated by two missing pixels. The two missing pixels located between vertices \mathbf{r}_i and \mathbf{r}_{i+1} , defined as pixels $1/3\mathbf{r}_i + 2/3\mathbf{r}_{i+1}$ and $2/3\mathbf{r}_i + 1/3\mathbf{r}_{i+1}$, were added to form a continuous contour. Since the cortical signal of GFP-tagged proteins encompassed approximately a 3-pixel wide contour, additional pixels were added to the selected contour using the following square convolution matrix (kernel mask):

$$K = \begin{pmatrix} 0 & 1 & 0 \\ 1 & 1 & 1 \\ 0 & 1 & 0 \end{pmatrix} \quad (3.1)$$

Then, the intensity values of all selected pixels were extracted from the image using Python custom-written script. In analogy with the dipole moment in electrostatics, the intensity vector was defined as:

$$\mathbf{p} = \sum_{i \in \mathcal{C}} I_i (\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_0) \quad (3.2)$$

where \mathcal{C} is the ensemble of all pixels from a selected contour (for a given cell at a given time), I_i is the intensity of pixel i and \mathbf{r}_i the position of pixel i . \mathbf{r}_0 is the geometrical center, i.e. centroid, of the corresponding ensemble of positions:

$$\mathbf{r}_0 = \frac{1}{|\mathcal{C}|} \sum_{i \in \mathcal{C}} \mathbf{r}_i \quad (3.3)$$

To effectively compare polarity vectors between cells of slightly different sizes and intensities, the intensity vector was normalized by the total intensity. The resulting polarity vector was defined as:

$$\mathbf{p}_n = \frac{1}{(\sum_{i \in \mathcal{C}} I_i) \sqrt{\frac{1}{|\mathcal{C}|} \sum_{i \in \mathcal{C}} \|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_0\|^2}} \sum_{i \in \mathcal{C}} I_i (\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_0) \quad (3.4)$$

This vector was used to measure planar polarization in all cells at all time points in this study. The orientation of this vector was then determined using $\pi/2$ as the coordinate value for the axis pointing posteriorly such that the mean value of a collection of randomly oriented vectors would be π . All data were then analyzed and represented using the R statistical package. To smoothen the raw data profiles, we calculated the mean magnitude value for a given cell over ten time points, i.e. 50 mn, and a Bootstrap analysis were performed on these mean values (100 iterations). The standard errors to the mean were plotted on all profiles.

Image analysis: analysis of intensity profiles and synthetic cells

To analyze the distribution of GFP at the cell cortex, the cell contour obtained from the image analysis was first resampled to yield a fixed number ($n = 64$) of evenly spaced points. Each of the pixels in the vicinity of the contour was then assigned to the closest of these points. Finally, an intensity value was computed for each point by averaging the intensity of its assigned pixels. Intensity values were normalized such that their average in each cell was equal to 1. The intensity profile in a cell is thus represented by a list of values i_k , $k = 1 \dots n$, satisfying $\sum_k i_k = n$.

These points were then classified as belonging to a high-intensity region or to the background depending on whether their intensity was above or below the average intensity along the contour (that is, $i_k > 1$ or $i_k < 1$). High-intensity regions that contained multiple intensity peaks (local maxima) were split into individual patches; the boundary between two patches was defined to be the point of lowest intensity (local minimum) between them. Finally, the background intensity i_{bg} at the cell cortex was estimated as the average intensity of background points,

$$i_{bg} = \frac{1}{\#bgpoints} \sum_{k \in bgpoints} i_k \quad (3.5)$$

and each patch was assigned an intensity I_{patch} corresponding to the total intensity above background of its points:

$$i_{patch} = \frac{1}{n} \sum_{k \in patch} (i_k - i_{bg}) \quad (3.6)$$

with the convention that the intensity of boundary points (local minima) between two patches was divided evenly between them. I_{patch} values were then normalized so as to represent the fraction of the total signal in the cell that is assigned to the patch. Pooling together all the cells of a given genetic background and cell type in a given time window yielded an average number of patches per cell and distribution of patch intensities.

To generate synthetic intensity profiles, patches were assumed to occur independently, at random, uniformly distributed locations along a circular contour. The number of patches in a synthetic profile was thus drawn from a Poisson distribution, and the intensity of each from the list of measured patch intensities. Neglecting the effect of finite patch sizes on the polarity vector, the patches were treated as point-like. The polarity vector for a synthetic profile comprised of m patches with intensities I_k , $k = 1 \dots m$, is thus

given by

$$\vec{p} = \sum_k I_k (\cos \theta_k \vec{e}_x + \sin \theta_k \vec{e}_y) \quad (3.7)$$

where the angle θ_k represents the location of patch k , drawn randomly in $[0, 2\pi]$ (implicitly, the patches in the synthetic profile are overlaid on a uniform background with intensity $i_{bg} = 1 - \sum_k I_k$; this uniform background does not contribute to the value of the polarity vector). The expected magnitude of the polarity vector under this model was estimated by averaging over a large number of randomly generated profiles.

Since the Baz polarity vector measured in SOPs showed a weak orientation bias at $t=-225$, it may come as a surprise that the average magnitude of measured polarity vectors was not larger than its synthetic counterpart. However, the effect of a weak polarization on the magnitude of the polarity vector can be expected to be small. Indeed, the mean square norm of the vector is equal to the variance of the vector plus the *square* of the mean polarity vector.

To calculate the mean fluorescence intensity of the apical area, we used the cell contour to select the pixels located within this contour with the exception of those located within a 3 pixel-wide band bordering this contour. These were excluded to avoid influence from high intensity values associated with the cell cortex. Pixel intensities were extracted and a mean value was calculated for each cell.

Cell shape analysis

The snakes from the GFP-Baz movies were converted to Fiji polygon ROI and both the area and solidity of these polygons were measured using Fiji plugins. Since area and solidity values in a given cell could be affected by the division of neighboring cells, these parameters were studied between -250 mn and -125 mn, i.e. prior to the first divisions of epi in the notum. For each cell, mean area and solidity values were calculated for the -250/-125 time interval and represented as boxplots. Distributions were compared using a Mann-Whitney-Wilcoxon test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$).

Laser Capture Microdissection, RNAseq and RTqPCR analysis

The notum of neur-GFPnls⁵⁵16-17 hr APF pupae were dissected in PBS 1x at RT and immediately dried and fixed in ethanol 100% on ice. Notum were then transferred onto PEN Membrane Frame Slides (Arcturus #LCM0521). Slides were kept at RT prior to LCM

(Arcturus LCM). A UV laser was used to cut GFP-positive SOPs and GFP-negative epi cells (10 μm diameter circles) and the IR laser was used to recover the cells into CapSure HS LCM caps (Arcturus #LCM0214). Caps were then transferred in 0.5 ml Eppendorf tubes containing 20 μl of Lysis Buffer from the RNAeasy Plus Micro Kit (Quiagen). Samples were kept at -80°C . Reverse transcription, primer removal, poly(A) tailing, second strand synthesis and PCR amplification (29 cycles) were performed exactly as described in⁵⁶. The resulting PCR products were sequenced on an Illumina HiSeq2000.¹⁶⁻²⁹ 106 reads per sample were mapped onto annotated release 5 FBtr transcripts. Statistical analysis was performed using the R software and Bioconductor package. Normalization and differential analysis were carried out according to the DESeq model⁵⁷ using the following parameters: method was "pooled"; fitType was "parametric" and sharing Mode was "maximum". The false discovery rate⁵⁸ was set at 0.1. RTqPCR analysis was performed as described in. Primer sequences are available upon request.

Endocytosis assay

Dissection and antibody staining were performed using standard procedures. Antibody uptake assays were performed on dissected wing discs. Following a 30 mn incubation at 4°C in S2 cell medium with goat anti-GFP (1:250, Abcam; iCrb), discs were transferred 1 hr at 25°C , then fixed in 4% PFA and stained for Sens with guinea pig anti-Sens (1:3,000; from H. Bellen). Secondary antibodies were from Jackson's laboratories. Immuno-stained nota were mounted in 4% N-propyl-galate, 80% glycerol and analyzed using an inverted LSM 780 (Carl Zeiss, Inc) confocal microscope.

FRAP analysis

Frap experiments were performed on an inverted LSM 780 (Carl Zeiss, Inc) confocal microscope using a 63x (HCX PL APO CS, N.A. 1.3). A $1 \times 3 \mu\text{m}$ box was defined as the FRAP area. Since no difference was observed in SOPs between anterior and posterior edges, FRAP data acquired from anterior and posterior edges were pooled for further analysis. A control area corresponding to the whole field of view was also acquired to measure bleaching over the period of acquisition. The mean initial, i.e. pre-bleach, intensity was measured over 10 time points (5s). The recovery curve was measured over 150 s ($\Delta t = 500 \text{ ms}$). The pinhole was opened to collect photons with a $2 \mu\text{m}$ z-resolution. All FRAP data were analyzed using easyFRAP (<http://ccl.med.upatras.gr/index.php?id=easyfrap>). The background noise due to auto-fluorescence was measured in control pupae and was subtracted to correct all FRAP data. Corrected data were then normal-

ized first for bleaching during the 150s recovery period using:

$$I(t)_1 = \left(\frac{\frac{1}{n_{pre}} \sum_{t=1}^{n_{pre}} I(t)_c}{I(t)_c} \right) \left(\frac{I(t)}{\frac{1}{n_{pre}} \sum_{t=1}^{n_{pre}} I(t)_c} \right) \quad (3.8)$$

where n_{pre} the number of time points before bleaching, $I(t)_c$ the intensity in the control area and $I(t)$ the intensity in the bleached area. Data then adjusted so that all recovery curves had the same point of origin:

$$I(t)_2 = \frac{I(t)_1 - I(t_{post-bleach})_1}{1 - I(t_{post-bleach})_1} \quad (3.9)$$

where $t_{post-bleach}$ is the first time point after bleach. Recovery curves were then fitted assuming a two-component equation using the GraphPad Prism 6.0 software:

$$I(t)_3 = I(t_0) + SpanFast(1 - e^{-Kfast.t}) + SpanSlow(1 - e^{-Kslow.t}) \quad (3.10)$$

$$SpanFast = 0.01(Plateau - I(t_0))PercentFast \quad (3.11)$$

$$SpanSlow = 0.01(Plateau - I(t_0))(100 - PercentFast) \quad (3.12)$$

The $Kfast$ and $Kslow$ constants were associated with the fast and slow mobility fractions, respectively. $Plateau$ was the normalized maximum recovery intensity. $PercentFast$ and $PercentSlow$ were the fractions of the recovery that were attributed to the fast and slow pools.

Acknowledgements

We thank S. Aerts, H. Bellen, K. Choi, Y. Hong, J. Knoblich, E. Knust, M. Krahm, P. Rorth, A. Spradling, D. Strutt, U. Tepass, R. Ueda, the Bloomington Drosophila Stock Center, Drosophila Genetic Research Center, Drosophila Genomics Resource Center and Flybase for flies, antibodies, DNA and other resources. We thank Z. Gomes for the initial observation of apical PatJ distribution in SOPs. We thank J.-Y. Coppee, M.-A. Dillies B. Jagla, O. Sismeiro from the PF2 platform for library preparation, RNAseq and statistical analysis. We thank all lab members for discussion. This work was funded by grants from the Agence Nationale pour la Recherche (ANR12-BSV2-0010-01 and Labex Revive) and the Pasteur-Weizmann fondation. C.B. received doctoral fellowships from the MENRT and ARC. F.B. was funded by an ARC post-doctoral fellowship.

References

1. Knoblich, J.A. Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell* **132**, 583-597 (2008).
2. Motegi, F. & Seydoux, G. The PAR network: redundancy and robustness in a symmetry-breaking system. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **368**, 20130010 (2013).
3. Cowan, C.R. & Hyman, A.A. Acto-myosin reorganization and PAR polarity in *C. elegans*. *Development* **134**, 1035-1043 (2007).
4. Schober, M., Schaefer, M. & Knoblich, J.A. Bazooka recruits Inscuteable to orient asymmetric cell divisions in *Drosophila* neuroblasts. *Nature* **402**, 548-551 (1999).
5. Wodarz, A., Ramrath, A., Kuchinke, U. & Knust, E. Bazooka provides an apical cue for Inscuteable localization in *Drosophila* neuroblasts. *Nature* **402**, 544-547 (1999).
6. Lu, B., Roegiers, F., Jan, L.Y. & Jan, Y.N. Adherens junctions inhibit asymmetric division in the *Drosophila* epithelium. *Nature* **409**, 522-525 (2001).
7. Gho, M. & Schweisguth, F. Frizzled signalling controls orientation of asymmetric sense organ precursor cell divisions in *Drosophila*. *Nature* **393**, 178-181 (1998).
8. Gho, M., Bellaiche, Y. & Schweisguth, F. Revisiting the *Drosophila* microchaete lineage: a novel intrinsically asymmetric cell division generates a glial cell. *Development* **126**, 3573-3584 (1999).
9. Hartenstein, V. & Posakony, J.W. Development of adult sensilla on the wing and notum of *Drosophila melanogaster*. *Development* **107**, 389-405 (1989).
10. Rhyu, M.S., Jan, L.Y. & Jan, Y.N. Asymmetric distribution of numb protein during division of the sensory organ precursor cell confers distinct fates to daughter cells. *Cell* **76**, 477-491. (1994).
11. Le Borgne, R. & Schweisguth, F. Unequal segregation of Neuralized biases Notch activation during asymmetric cell division. *Dev Cell* **5**, 139-148. (2003).
12. Couturier, L., Vodovar, N. & Schweisguth, F. Endocytosis by Numb breaks Notch symmetry at cytokinesis. *Nat Cell Biol* **14**, 131-139 (2012).
13. Bellaiche, Y., Gho, M., Kaltschmidt, J.A., Brand, A.H. & Schweisguth, F. Frizzled regulates localization of cell-fate determinants and mitotic spindle rotation during asymmetric cell division. *Nat Cell Biol* **3**, 50-57 (2001).
14. Goodrich, L.V. & Strutt, D. Principles of planar polarity in animal development. *Development* **138**, 1877-1892 (2011).

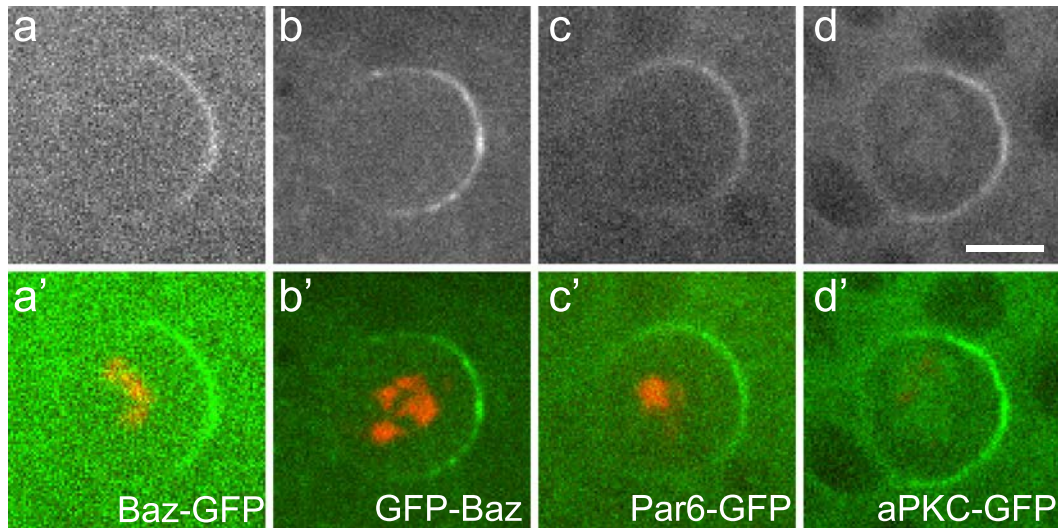
15. Seifert, J.R. & Mlodzik, M. Frizzled/PCP signalling: a conserved mechanism regulating cell polarity and directed motility. *Nat Rev Genet* **8**, 126-138 (2007).
16. Bellaïche, Y. *et al.* The Partner of Inscuteable/Discs-large complex is required to establish planar polarity during asymmetric cell division in *Drosophila*. *Cell* **106**, 355-366 (2001).
17. Segalen, M. *et al.* The Fz-Dsh planar cell polarity pathway induces oriented cell division via Mud/NuMA in *Drosophila* and zebrafish. *Dev Cell* **19**, 740-752 (2010).
18. Tepass, U. The apical polarity protein network in *Drosophila* epithelial cells: regulation of polarity, junctions, morphogenesis, cell growth, and survival. *Annu Rev Cell Dev Biol* **28**, 655-685 (2012).
19. Morais-De-Sa, E., Mirouse, V. & Johnston, D.S. aPKC Phosphorylation of Bazooka Defines the Apical/Lateral Border in *Drosophila* Epithelial Cells. *Cell* **141**, 509-523 (2010).
20. Walther, R.F. & Pichaud, F. Crumbs/DaPKC-dependent apical exclusion of Bazooka promotes photoreceptor polarity remodeling. *Curr Biol* **20**, 1065-1074 (2010).
21. Hayase, J. *et al.* The WD40 protein Morg1 facilitates Par6-aPKC binding to Crb3 for apical identity in epithelial cells. *J Cell Biol* **200**, 635-650 (2013).
22. St Johnston, D. & Ahringer, J. Cell polarity in eggs and epithelia: parallels and diversity. *Cell* **141**, 757-774 (2010).
23. Wei, S.Y. *et al.* Echinoid is a component of adherens junctions that cooperates with DE-Cadherin to mediate cell adhesion. *Dev Cell* **8**, 493-504 (2005).
24. Harris, T.J. & Peifer, M. The positioning and segregation of apical cues during epithelial polarity establishment in *Drosophila*. *J Cell Biol* **170**, 813-823 (2005).
25. Bulgakova, N.A., Grigoriev, I., Yap, A.S., Akhmanova, A. & Brown, N.H. Dynamic microtubules produce an asymmetric E-cadherin-Bazooka complex to maintain segment boundaries. *J Cell Biol* **201**, 887-901 (2013).
26. Wirtz-Peitz, F., Nishimura, T. & Knoblich, J.A. Linking cell cycle to asymmetric division: Aurora-A phosphorylates the Par complex to regulate Numb localization. *Cell* **135**, 161-173 (2008).
27. Buszczak, M. *et al.* The carnegie protein trap library: a versatile tool for *Drosophila* developmental studies. *Genetics* **175**, 1505-1531 (2007).
28. Petronczki, M. & Knoblich, J.A. DmPAR-6 directs epithelial polarity and asymmetric cell division of neuroblasts in *Drosophila*. *Nat Cell Biol* **3**, 43-49 (2001).
29. Bellaïche, Y., Beaudoin-Massiani, O., Stuttem, I. & Schweisguth, F. The planar cell polarity protein Strabismus promotes Pins anterior localization during asymmetric

- p>division of sensory organ precursor cells in Drosophila.
- Development*
- 131**
- , 469-478 (2004).
30. Schaefer, M., Shevchenko, A., Shevchenko, A. & Knoblich, J.A. A protein complex containing Inscuteable and the Galpha-binding protein Pins orients asymmetric cell divisions in Drosophila. *Curr Biol* **10**, 353-362 (2000).
 31. Huang, J., Zhou, W., Dong, W., Watson, A.M. & Hong, Y. Directed, efficient, and versatile modifications of the Drosophila genome by genomic engineering. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 8284-8289 (2009).
 32. Bachmann, A., Schneider, M., Theilenberg, E., Grawe, F. & Knust, E. Drosophila Stardust is a partner of Crumbs in the control of epithelial cell polarity. *Nature* **414**, 638-643 (2001).
 33. Sen, A., Nagy-Zsver-Vadas, Z. & Krahn, M.P. Drosophila PATJ supports adherens junction stability by modulating Myosin light chain activity. *J Cell Biol* **199**, 685-698 (2012).
 34. Zhou, W. & Hong, Y. Drosophila Patj plays a supporting role in apical-basal polarity but is essential for viability. *Development* **139**, 2891-2896 (2012).
 35. Pocha, S.M., Wassmer, T., Niehage, C., Hoflack, B. & Knust, E. Retromer controls epithelial cell polarity by trafficking the apical determinant Crumbs. *Curr Biol* **21**, 1111-1117 (2011).
 36. Zhou, B., Wu, Y. & Lin, X. Retromer regulates apical-basal polarity through recycling Crumbs. *Dev Biol* **360**, 87-95 (2011).
 37. Buffin, E. & Gho, M. Laser microdissection of sensory organ precursor cells of Drosophila microchaetes. *PLoS One* **5**, e9285.
 38. Reeves, N. & Posakony, J.W. Genetic programs activated by proneural proteins in the developing Drosophila PNS. *Dev Cell* **8**, 413-425 (2005).
 39. Rouault, H., Mazouni, K., Couturier, L., Hakim, V. & Schweisguth, F. Genome-wide identification of cis-regulatory motifs and modules underlying gene coregulation using statistics and phylogeny. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 14615-14620 (2010).
 40. Castro, B., Barolo, S., Bailey, A.M. & Posakony, J.W. Lateral inhibition in proneural clusters: cis-regulatory logic and default repression by Suppressor of Hairless. *Development* **132**, 3333-3344 (2005).
 41. Ling, C. *et al.* The apical transmembrane protein Crumbs functions as a tumor suppressor that regulates Hippo signaling by binding to Expanded. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 10532-10537 (2010).

42. Robinson, B.S., Huang, J., Hong, Y. & Moberg, K.H. Crumbs regulates Salvador/Warts/Hippo signaling in Drosophila via the FERM-domain protein Expanded. *Curr Biol* **20**, 582-590 (2010).
43. Hamaratoglu, F. *et al.* The tumour-suppressor genes NF2/Merlin and Expanded act through Hippo signalling to regulate cell proliferation and apoptosis. *Nat Cell Biol* **8**, 27-36 (2006).
44. Myster, S.H., Cavallo, R., Anderson, C.T., Fox, D.T. & Peifer, M. Drosophila p120catenin plays a supporting role in cell adhesion but is not an essential adherens junction component. *J Cell Biol* **160**, 433-449 (2003).
45. Hamaratoglu, F. *et al.* The Hippo tumor-suppressor pathway regulates apical-domain size in parallel to tissue growth. *J Cell Sci* **122**, 2351-2359 (2009).
46. Yu, J. *et al.* Kibra functions as a tumor suppressor protein that regulates Hippo signaling in conjunction with Merlin and Expanded. *Dev Cell* **18**, 288-299 (2010).
47. Genevet, A., Wehr, M.C., Brain, R., Thompson, B.J. & Tapon, N. Kibra is a regulator of the Salvador/Warts/Hippo signaling network. *Dev Cell* **18**, 300-308 (2010).
48. Chen, C.L. *et al.* The apical-basal cell polarity determinant Crumbs regulates Hippo signaling in Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 15810-15815 (2010).
49. Wasserscheid, I., Thomas, U. & Knust, E. Isoform-specific interaction of Flamingo/Starry Night with excess Bazooka affects planar cell polarity in the Drosophila wing. *Dev Dyn* **236**, 1064-1071 (2007).
50. Lu, B., Usui, T., Uemura, T., Jan, L. & Jan, Y.N. Flamingo controls the planar polarity of sensory bristles and asymmetric division of sensory organ precursors in Drosophila. *Curr Biol* **9**, 1247-1250 (1999).
51. Djiane, A., Yogev, S. & Mlodzik, M. The apical determinants aPKC and dPatj regulate Frizzled-dependent planar cell polarity in the Drosophila eye. *Cell* **121**, 621-631 (2005).
52. Januschke, J. & Gonzalez, C. The interphase microtubule aster is a determinant of asymmetric division orientation in Drosophila neuroblasts. *J Cell Biol* **188**, 693-706 (2010).
53. Johnston, C.A., Hirono, K., Prehoda, K.E. & Doe, C.Q. Identification of an Aurora-A/PinsLINKER/Dlg spindle orientation pathway using induced cell polarity in S2 cells. *Cell* **138**, 1150-1163 (2009).
54. Venken, K.J. *et al.* Versatile P[acman] BAC libraries for transgenesis studies in Drosophila melanogaster. *Nat Methods* **6**, 431-434 (2009).

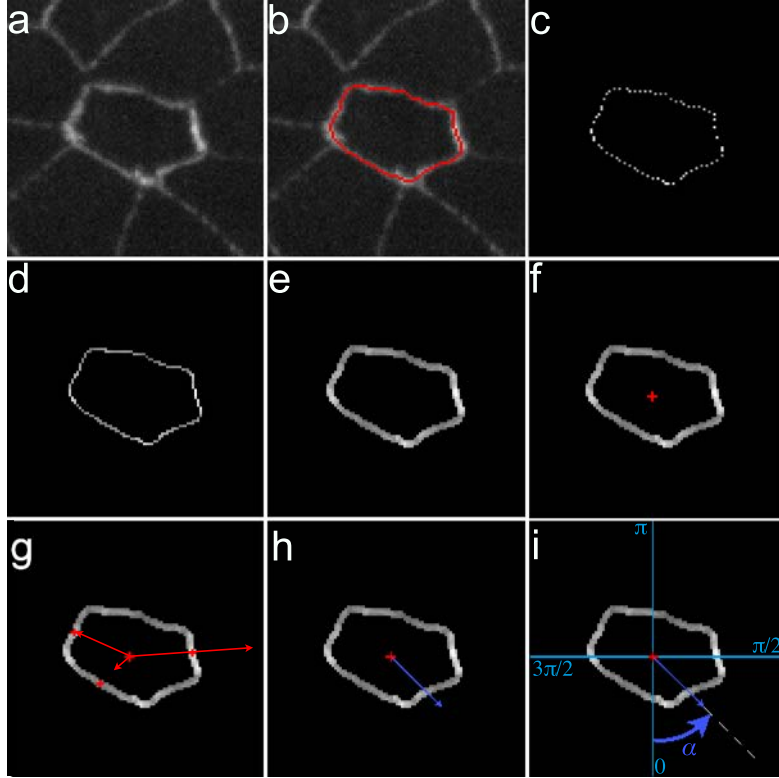
55. Aerts, S. *et al.* Robust target gene discovery through transcriptome perturbations and genome-wide enhancer predictions in *Drosophila* uncovers a regulatory basis for sensory specification. *PLoS Biol* **8**, e1000435 (2010).
56. Tang, F. *et al.* RNA-Seq analysis to capture the transcriptome landscape of a single cell. *Nature protocols* **5**, 516-535 (2010).
57. Anders, S. & Huber, W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* **11**, R106 (2010).
58. Benjamini, Y. & Hochberg, Y. Controlling the False Discovery Rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of Royal Statistical Society* **57**, 289-300 (1995).
59. Gomes, J.E., Corado, M. & Schweisguth, F. Van Gogh and Frizzled act redundantly in the *Drosophila* sensory organ precursor cell to orient its asymmetric division. *PLoS One* **4**, e4485 (2009).
60. Penalva, C. & Mirouse, V. Tissue-specific function of Patj in regulating the Crumbs complex and epithelial polarity. *Development* **139**, 4549-4554 (2012).
61. Berger, S., Bulgakova, N.A., Grawe, F., Johnson, K. & Knust, E. Unraveling the genetic complexity of *Drosophila* stardust during photoreceptor morphogenesis and prevention of light-induced degeneration. *Genetics* **176**, 2189-2200 (2007)...

Supplementary Data



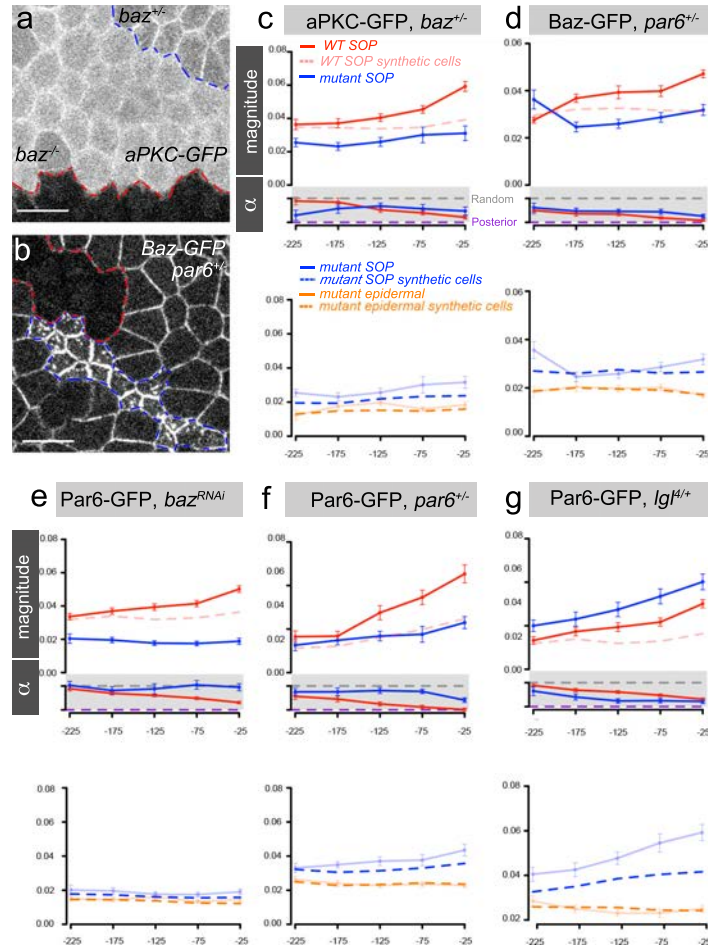
Article Figure SUP 1 – localization of GFP-tagged proteins in dividing SOPs

(a-d') Snapshots from live movies showing the localization of Baz-GFP (a,a'), GFP-Baz (b,b'), Par6-GFP (c,c') and aPKC-GFP (d,d') in mitotic SOPs (identified using H2B-RFP, red; GFP-tagged proteins, green). Note that Baz-GFP has a lower fluorescence signal than GFP-Baz. This might be due to higher turn-over of Baz-GFP, elevated expression of GFP-Baz due to a regulatory mutation caused by the insertion of the protein-trap P-element, or low expression of Baz-GFP associated with the genomic site where the BAC was inserted. Whatever the basis, both fusion were functional by genomic rescue assay. Moreover, the measured planar polarity vector was intensity normalized. Scale bar is $5\mu\text{m}$.



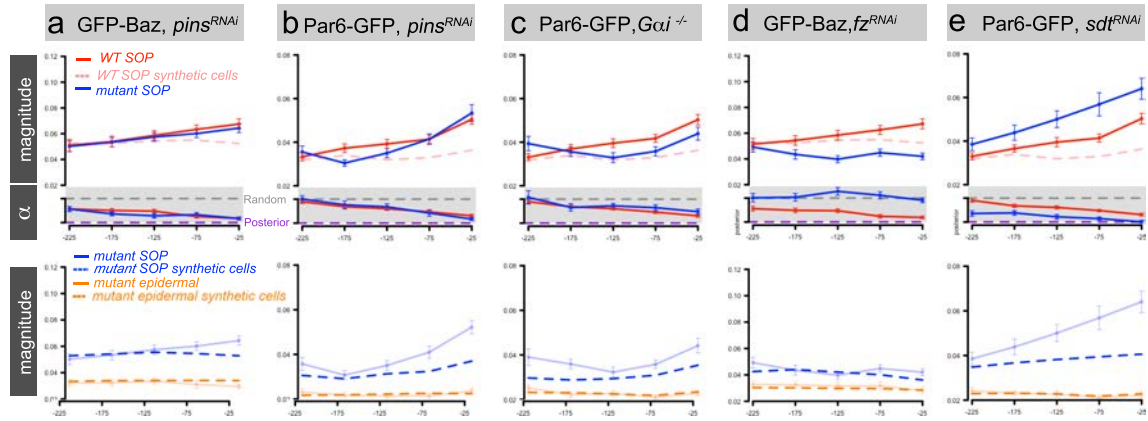
Article Figure SUP 2 – building a polarity vector

For a given cell at a given time, a polarity vector is built in a stepwise manner that involves selecting the cell to be analyzed (a), defining the cell contour using the Fiji JFilament plugin (b) which results in a list of pixels stored by JFilament, adding extra pixels to obtain a continuous contour (d), enlarging this contour to obtain a 3-pixel wide contour (e), determining the centroid is determined (f), calculating for each pixel an intensity vector (red) proportional to its intensity (g; for clarity, only three vectors are showed), calculating a mean polarity vector (blue) from all intensity vectors (h; this vector is normalized by the mean intensity of the contour), calculating the orientation angle (α) of the polarity vector. A vector oriented towards the posterior pole will have $\alpha = \pi/2$ whereas an anterior oriented vector will have $\alpha = 3\pi/2$.



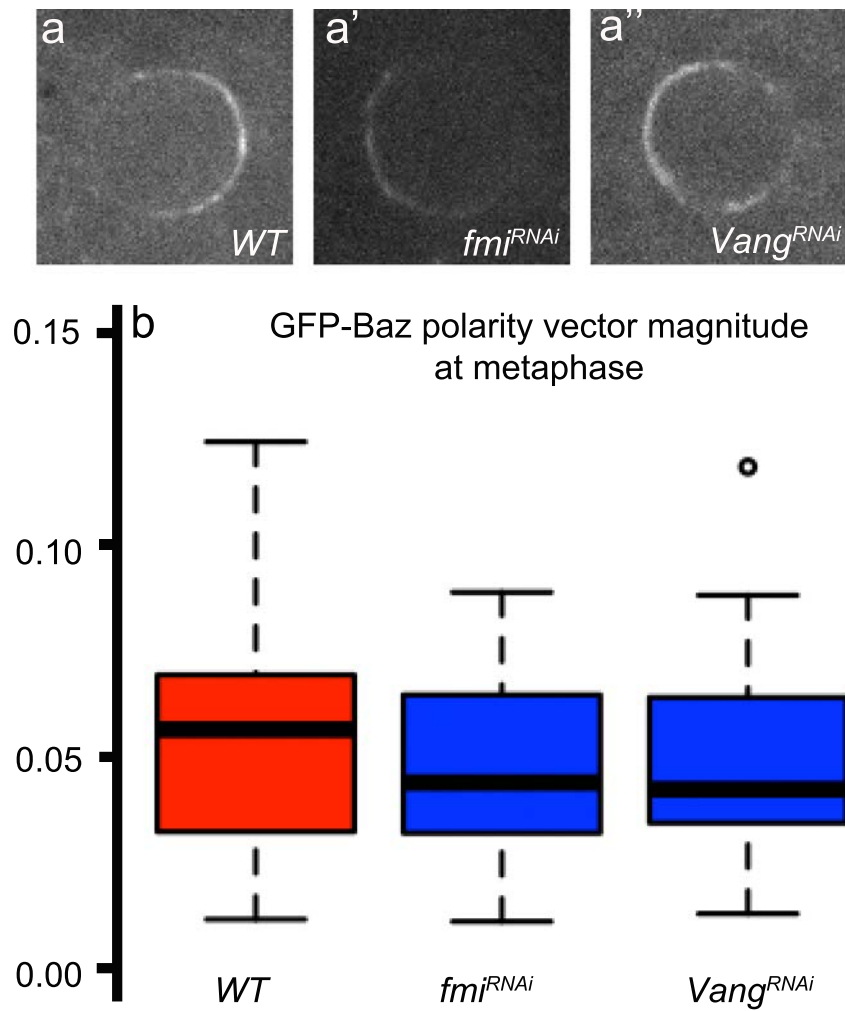
Article Figure SUP 3 – cross-regulatory interactions between Baz, Par6 and aPKC

(a) aPKC-GFP localization in *baz* homozygous mutant cells (that have 2 copies of aPKC-GFP) and *baz* heterozygous cells (that have 1 copy of aPKC-GFP; note that the *baz*^{+/+} cells at the bottom do not carry the aPKC-GFP transgene). A large fraction of aPKC-GFP localized in the cytoplasm in the absence of Baz. (b) Baz-GFP localization in *par6* homozygous mutant (2 copies of Baz-GFP; clone border, blue) and *par6* heterozygous cells (1 copy of Baz-GFP). The wild-type cells of the twin clone (clone border, red) do not carry the Baz-GFP transgene. Mutant clones were small and mutant cells showed reduced apical area. Baz was also detected in cytoplasmic dots in the absence of Par6. (c-f) measured and synthetic cell profiles of the aPKC-GFP (c, n=13), Baz-GFP (d, n=31), Par6-GFP (e, n=20 and f, n=31) polarity vectors (blue) in *baz* heterozygous (c), *par6* heterozygous (d,f) and *baz*^{RNAi} SOPs (e) compared to the corresponding wild-type profile (red, as in Figure 1c' for panel e; controls of heterozygous *par6* and *baz* female pupae were also female pupae: aPKC-GFP, n=35; Baz-GFP, n=39; Par6-GFP, n=29). (g) measured and synthetic cell profiles of the Par6-GFP polarity vectors (blue; n=26) in *lgl* heterozygous pupae compared to control profiles (red, as in Figure 2c').



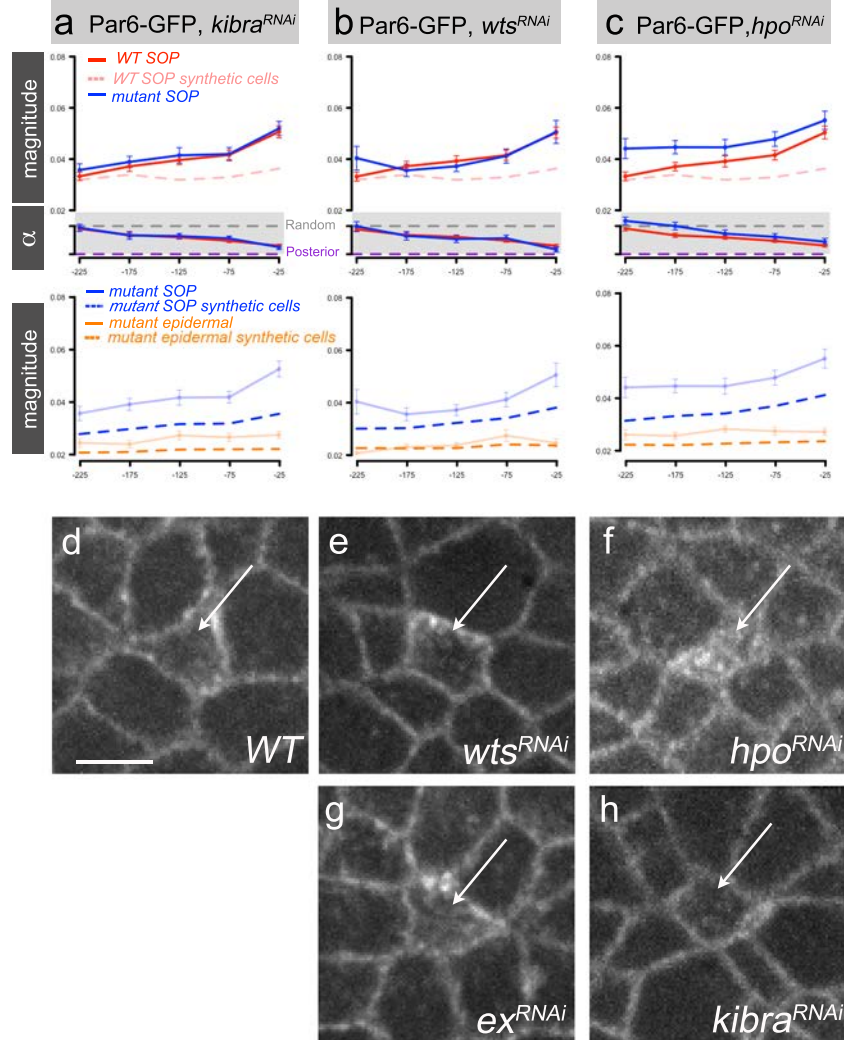
Article Figure SUP 4 – Planar polarization of Par6 and Baz in various silencing contexts

(a-e) measured and synthetic cell profiles of the following polarity vectors: GFP-Baz in *pins^{RNAi}* SOPs (a, n=34), Par6-GFP in *pins^{RNAi}* (b, n=33) and *Gai* mutant SOPs (c, n=31), GFP-Baz in *fzRNAi* SOPs (d, n=26), Par6-GFP in *sdtRNAi* SOPs (e, n=29) compared to the corresponding wild-type profile (red, as in Figure 2a',c').



Article Figure SUP 5 – GFP-Baz localization at mitosis in *fmi^{RNAi}* and *Vang^{RNAi}* SOPs

(a-a'') asymmetric localization of GFP-Baz in control (a), *fmi^{RNAi}* (a') and *Vang^{RNAi}* (a'') SOPs at mitosis. A GFP-Baz crescent was detected, albeit randomly oriented. (b) Boxplots showing the distribution of the magnitudes values measured for the GFP-Baz polarity vectors in control, *fmi^{RNAi}* and *Vang^{RNAi}* SOPs at mitosis.



Article Figure SUP 6 – Role of Hippo signaling in the planar polarization of Par6

(a-c) measured and synthetic cell profiles of Par6-GFP polarity vectors measured in *kibra*^{RNAi} (a, n=37), *wts*^{RNAi} (b, n=26) and *hpo*^{RNAi} (c, n=40) SOPs compared to the corresponding wild-type profile (red, as in Figure 2a',c'). (d-h) distribution of Par6-GFP pupae in control (d), *wts*^{RNAi} (e), *hpo*^{RNAi} (f), *ex*^{RNAi} (g), and *kibra*^{RNAi} (h) pupae (SOPs, identified using H2-RFP, are indicated with an arrow). Par6-GFP was delocalized from the cortex of all cells in *hpo*^{RNAi} pupae. This effect was not observed in other silencing contexts.

Table S1: genotypes

Figure 1:

- (a) $Y / w, P[w+, FRT9-2/18E, f, baz^{[815.8]}, P\{CaryP, PB[BAC Baz-sfGFP2/attP18]\}; P\{w[+mW.hs]=GawB\}pnr^{[md237]}, P[mw, pNeurD-H2B-RFP]-3-2 / +$
- (b) $Y / w, baz-GFP^{[cc01941]}; P\{w[+mW.hs]=GawB\}pnr^{[md237]}, P[mw, pNeurD-H2B-RFP]-3-2 / +$
- (c) $Y / w, P[w+, FRT9-2/18E, par6^{[226]}, P[promPar6_Par6-eGFP, mw]^{61-1f}, P[mw, pNeurA-H2B-RFP]-1; P\{w[+mW.hs]=GawB\}pnr^{[md237]}, P[mw, pNeurD-H2B-RFP]-3-2 / +$
- (d) $Y / w, PB\{y+ attP[BAC aPKC-GFP]-3B\}VK38-5B8, P[mw, pNeurA-H2B-RFP]-1; P\{w[+mW.hs]=GawB\}pnr^{[md237]}, P[mw, pNeurD-H2B-RFP]-3-2 / +$

Notes:

$P[promPar6_Par6-eGFP, mw]^{61-1f}$ is Par6-GFP, obtained from J. Knoblich²⁸

$PB[BAC Baz-sfGFP2/attP18]$ is Baz-GFP, this study

$baz-GFP^{[cc01941]}$ is GFP-Baz, obtained from A. Spradling²⁷

$PB\{y+ attP[BAC aPKC-GFP]-3B\}VK38-5B8$ is aPKC-GFP, this study

$P[mw, pNeurA-H2B-RFP]-1$ and $P[mw, pNeurD-H2B-RFP]-3-2$ correspond to Histone2B-RFP markers expressed in SOPs⁵⁹.

pnr-Gal4 is $P\{w[+mW.hs]=GawB\}pnr^{[md237]}$

Figure 2:

same as in Figure 1

Figure 3:

- (a) $Y / w, P[w+, FRT9-2/18E, par6^{[226]}, P[promPar6_Par6-eGFP, mw]^{61-1f}, P[mw, pNeurA-H2B-RFP]-1; ; P\{w[+mW.hs]=GawB\}pnr^{[md237]}, P[mw, pNeurD-H2B-RFP]-3-2 / P[mw, UAS-CG11895RNAi]\#1$
- (b) $Y / w, P[w+, FRT9-2/18E, par6^{[226]}, P[promPar6_Par6-eGFP, mw]^{61-1f}, P[mw, pNeurA-H2B-RFP]-1; ; P\{w[+mW.hs]=GawB\}pnr^{[md237]}, P[mw, pNeurD-H2B-RFP]-3-2 / P[mw, UAS-dsRNA stbm]$
- (c) $Y / w, baz-GFP^{[cc01941]}; ; P\{w[+mW.hs]=GawB\}pnr^{[md237]}, P[mw, pNeurD-H2B-RFP]-3-2 / P[mw, UAS-CG11895RNAi]\#1$

- (d) $Y / w, baz-GFP^{[cc01941]}; ; P\{w[+mW.hs]=GawB\}pnr^{[md237]}, P[mw, pNeurD-H2B-RFP]-3-2 / P[mw, UAS-dsRNA stbm]$

Notes:

$P[mw, UAS-CG11895RNAi]/\#1$ is $fm\bar{i}^{rnai}$ from R. Ueda

$P[mw, UAS-dsRNA stbm]$ is $Vang^{rnai}$ from D. Strutt

Figure 4:

- (b) $Y / w, P[mw, pNeurA-H2B-RFP]-1; ; Crb-GFP-C, P\{w[+mW.hs]=GawB\}pnr^{[md237]} / Crb-GFP-C$
- (c) $Y / w; PB\{y+ attP[BAC Patj-sfGFP]-3B\}VK37-22A3; P[mw, FRT2A/79D-F patj^{53}]$
- (d) $Y / y w, sdt^{k85} P[neo, FRT/19A; PB\{y+ attP[BAC Sdt-sfGFP]-3B\}ZH-51C]/+$
- (f') see (b)
- (f'') $Y / w, P[mw, pNeurA-H2B-RFP]-1; Crb-GFP-C, P\{w[+mW.hs]=GawB\}pnr^{[md237]} / Crb-GFP-C, P[y[+], v[+], UAS-dsRNA vps35]/attP40$
- (g) $Y / w, P[w+, FRT9-2/18E, f, baz^{[815.8]}, P\{CaryP, PB[BAC Baz-sfGFP2]/attP18\}; P[mw, Ubx-flp], P[mw, pNeurD-H2B-RFP]-2-2 / +; P\{ry[+t7.2]=neoFRT\}82B, P\{w[+mC]=Ubi-mRFP.nls\}3R / P\{ry[+t7.2]=neoFRT\}82B, e, crb^{11a22}$
- (h) $Y / w, baz-GFP^{[cc01941]}; P[mw, Ubx-flp], P[mw, pNeurD-H2B-RFP]-2-2 / +; P\{ry[+t7.2]=neoFRT\}82B, P\{w[+mC]=Ubi-mRFP.nls\}3R / P\{ry[+t7.2]=neoFRT\}82B, e, crb^{11a22}$
- (i) $Y / w, P[w+, FRT9-2/18E, par6^{[226]}, P[promPar6_Par6-eGFP, mw]^{61-1f}, P[mw, pNeurA-H2B-RFP]-1; P[mw, Ubx-flp], P[mw, pNeurD-H2B-RFP]-2-2 / +; P\{ry[+t7.2]=neoFRT\}82B, P\{w[+mC]=Ubi-mRFP.nls\}3R / P\{ry[+t7.2]=neoFRT\}82B, e, crb^{11a22}$
- (j) $Y / w, P[w+, FRT9-2/18E, par6^{[226]}, P[promPar6_Par6-eGFP, mw]^{61-1f}, P[mw, pNeurA-H2B-RFP]-1; P[mw, Ubx-flp], P[mw, pNeurD-H2B-RFP]-2-2 / +; P\{ry[+t7.2]=neoFRT\}82B, P\{w[+mC]=Ubi-mRFP.nls\}3R / P\{ry[+t7.2]=neoFRT\}82B, e, crb^{11a22}$
- (k) $Y / w, baz-GFP^{[cc01941]}; ; P\{w[+mW.hs]=GawB\}pnr^{[md237]}, P[mw, pNeurD-H2B-RFP]-3-2 / P[y[+], v[+], UAS-dsRNA vps35]/attP40$
- (l) $Y / w, P[w+, FRT9-2/18E, par6^{[226]}, P[promPar6_Par6-eGFP, mw]^{61-1f}, P[mw, pNeurA-H2B-RFP]-1; P\{w[+mW.hs]=GawB\}pnr^{[md237]}, P[mw, pNeurD-$

H2B-RFP]-3-2 / *P*[*y*+[], *v*+[], *UAS-dsRNA vps35*]*attP40*

- **(m)** *Y* / *w*, *P*[*w*+, *FRT9-2*]/18*E*, *par6*^[226], *P*[*promPar6_Par6-eGFP*, *mw*]^{61-1f}, *P*[*mw*, *pNeurA-H2B-RFP*]-1; ; *P*{*w*+[*mW.hs*]=*GawB*}*pnr*^[md237], *P*[*mw*, *pNeurD-H2B-RFP*]-3-2 / *P*[*mw*, *UAS-dsRNA stbm*], *P*[*y*+[], *v*+[], *UAS-dsRNA vps35*]*attP40*

Notes:

Crb-GFP-C was from Y. Hong³¹

PB{*y*+ *attP*[*BAC Patj-sfGFP*]-3*B*}*VK37-22A3* is *Patj-GFP*, this study

PB{*y*+ *attP*[*BAC Sdt-sfGFP*]-3*B*}*ZH-51C*] is *Sdt-GFP*, this study

*patj*⁵³ was obtained from V. Mirouse⁶⁰

sdt^{k85} was obtained from E. Knust⁶¹

crb^{11a22} was obtained from E. Knust

P[*y*+[], *v*+[], *UAS-dsRNA vps35*]*attP40* is *vps35^{mai}* and was obtained from Bloomington (BL-38944)

Figure 6:

- **(a,d,j)** *Y* / *w*, *P*[*w*+, *FRT9-2*]/18*E*, *par6*^[226], *P*[*promPar6_Par6-eGFP*, *mw*]^{61-1f}, *P*[*mw*, *pNeurA-H2B-RFP*]-1; ; *P*{*w*+[*mW.hs*]=*GawB*}*pnr*^[md237], *P*[*mw*, *pNeurD-H2B-RFP*]-3-2 / *P*[*mw*, *UAS-dsRNA p120ctn*]/700
- **(a',b,c,e,j)** *Y* / *w*, *baz-GFP*^[cc01941]; ; *P*{*w*+[*mW.hs*]=*GawB*}*pnr*^[md237], *P*[*mw*, *pNeurD-H2B-RFP*]-3-2 / *P*[*mw*, *UAS-dsRNA p120ctn*]/700
- **(b,c)** *Y* / *w*, *baz-GFP*^[cc01941]; ; *P*{*w*+[*mW.hs*]=*GawB*}*pnr*^[md237], *P*[*mw*, *pNeurD-H2B-RFP*]-3-2 / *P*[*y*+[], *v*+[], *UAS-dsRNA crb*]*attP2*
- **(b,c)** *Y* / *w*, *baz-GFP*^[cc01941]; ; *P*{*w*+[*mW.hs*]=*GawB*}*pnr*^[md237], *P*[*mw*, *pNeurD-H2B-RFP*]-3-2 / *P*[*mw*, *UAS-dsRNA stbm*]
- **(g)** *Y* / *w* ; *E-Cad-GFP* / +; *P*{*w*+[*mW.hs*]=*GawB*}*pnr*^[md237], *P*[*mw*, *pNeurD-H2B-RFP*]-3-2 / +
- **(h)** *Y* / *w*, *PB*{*y*+ *attP*[*BAC aPKC-GFP*]-3*B*}*VK38-5B8*], *P*[*mw*, *pNeurA-H2B-RFP*]-1; ; *P*{*w*+[*mW.hs*]=*GawB*}*pnr*^[md237], *P*[*mw*, *pNeurD-H2B-RFP*]-3-2 / +
- **(i)** *Y* / *w*, *P*[*w*+, *FRT9-2*]/18*E*, *par6*^[226], *P*[*promPar6_Par6-eGFP*, *mw*]^{61-1f}, *P*[*mw*, *pNeurA-H2B-RFP*]-1; ; *P*{*w*+[*mW.hs*]=*GawB*}*pnr*^[md237], *P*[*mw*, *pNeurD-H2B-RFP*]-3-2 / +
- **(l)** *Y* / *w*, *P*[*w*+, *FRT9-2*]/18*E*, *f*, *baz*^[815.8], *P*{*CaryP*, *PB*[*BAC Baz-sfGFP2*]*attP18*}; ; *P*{*w*+[*mW.hs*]=*GawB*}*pnr*^[md237], *P*[*mw*, *pNeurD-H2B-RFP*]-3-2 / +
- **(m)** *Y* / *w*, *P*[*w*+, *FRT9-2*]/18*E*, *f*, *baz*^[815.8], *P*{*CaryP*, *PB*[*BAC Baz-*

sfGFP2/attP18}; $P\{w[+mW.hs]=GawB\}pnr^{[md237]}$, $P[mw, pNeurD-H2B-RFP]-3-2/w$, $P[w+, FRT9-2/18E, par6-226, P\{CaryP, PB[BAC Baz-sfGFP2/attP18]$

Notes:

$P[mw, UAS-dsRNA p120ctn/700]$ is $p120ctn^{nai}$ and was obtained from P. Rorth
 $P[y[+], v[+], UAS-dsRNA crb/attP2]$ is crb^{nai} and was obtained from Bloomington (BL-40869)
E-Cad-GFP was obtained from Y. Hong³¹

Figure 7:

- (a) $Y / w, P[mw, pNeurA-H2B-RFP]-1; ; Crb-GFP-C, P\{w[+mW.hs]=GawB\}pnr^{[md237]} / Crb-GFP-C$
- (b) $Y / w, P[mw, pNeurA-H2B-RFP]-1; ; Crb-GFP-C, P\{w[+mW.hs]=GawB\}pnr^{[md237]} / P[mw, UAS-dsRNA ex] Crb-GFP-C$
- (c) $Y / w, P[w+, FRT9-2/18E, par6^{[226]}, P[promPar6_Par6-eGFP, mw]^{61-1f}, P[mw, pNeurA-H2B-RFP]-1; ; P\{w[+mW.hs]=GawB\}pnr^{[md237]}, P[mw, pNeurD-H2B-RFP]-3-2 / P[mw, UAS-dsRNA ex]$
- (d) $Y / w, baz-GFP^{[cc01941]}; ; P\{w[+mW.hs]=GawB\}pnr^{[md237]}, P[mw, pNeurD-H2B-RFP]-3-2 / P[mw, UAS-dsRNA ex]$
- (e) $Y / w ; P\{w[+mW.hs]=GawB\}ap[md544] / + ; Crb-GFP-A / P[mw, UAS-dsRNA ex] Crb-GFP-A$

Notes:

$P[mw, UAS-dsRNA ex]$ is ex^{nai} and was obtained from the VDRC (ID109281 KK)
 $P\{w[+mW.hs]=GawB\}ap[md544]$ is ap-Gal4
Crb-GFP-A was obtained from Y. Hong³¹; GFP is extracellular in this Crb fusion protein.

Figure S1:

same as in Figure 1

Figure S3:

- (a) **baz clones with aPKC-GFP :**
 $w, P[w+, FRT9-2/18E, PB\{y+ attP[BAC aPKC-GFP]-3B\}VK38-5B8], baz^{[815.8]} / w, P[w+, FRT9-2/18E ; P[mw, Ubx-flp], P[mw, pNeurD-H2B-RFP]-2-2 / +$
- (b) **par6 clones with Baz-GFP :**
 $w, P[w+, FRT9-2/18E, par6^{[226]}, P\{CaryP, PB[BAC Baz-sfGFP2/attP18] / w,$

- $P[w+, FRT9-2/18E ; P[mw, Ubx-flp], P[mw, pNeurD-H2B-RFP]-2-2 / +$
- **(c) one copy of baz with aPKC-GFP :**
 $w, P[w+, FRT9-2/18E, PB\{y+ attP[BAC aPKC-GFP]-3B\}VK38-5B8], baz^{[815.8]} /$
 $w, PB\{y+ attP[BAC aPKC-GFP]-3B\}VK38-5B8], w P[mw, pNeurA-H2B-RFP]-$
 $1; ; P\{w[+mW.hs]$
 $=GawB\}pnr^{[md237]}, P[mw, pNeurD-H2B-RFP]-3-2 / +$
 - **(d) one copy of par6 with Baz-GFP:**
 $w, P[w+, FRT9-2/18E, par6^{[226]}, P\{CaryP, PB[BAC Baz-sfGFP2]attP18\} / w,$
 $P[w+, FRT9-2/18E, f, baz^{[815.8]}, P\{CaryP, PB[BAC Baz-sfGFP2]attP18\} ; ;$
 $P\{w[+mW.hs]=GawB\}pnr^{[md237]}, P[mw, pNeurD-H2B-RFP]-3-2 / +$
 - **wild-type control for (d):**
 $w, P[w+, FRT9-2/18E, f, baz^{[815.8]}, P\{CaryP, PB[BAC Baz-sfGFP2]attP18\} ; ;$
 $P\{w[+mW.hs]=GawB\}pnr^{[md237]}, P[mw, pNeurD-H2B-RFP]-3-2 / +$
 - **(e) baz^{mai} with Par6-GFP:**
 $Y / w, P[w+, FRT9-2/18E, par6^{[226]}, P[promPar6_Par6-eGFP, mw]^{61-1f}, P[mw,$
 $pNeurA-H2B-RFP]-1 ; ; P\{w[+mW.hs]=GawB\}pnr^{[md237]}, P[mw, pNeurD-H2B-$
 $RFP]-3-2 / P[mw, UAS-dsRNA baz]$
 - **(f) one copy of par6 with Par6-GFP:**
 $w, P[w+, FRT9-2/18E, par6^{[226]}, P[promPar6_Par6-eGFP, mw]^{61-1f},$
 $P[mw, pNeurA-H2B-RFP]-1 / w, P[w+, FRT9-2/18E, par6^{[226]} ; ;$
 $P\{w[+mW.hs]=GawB\}pnr^{[md237]}, P[mw, pNeurD-H2B-RFP]-3-2 / +$
 - **wild-type control for (f) :**
 $w, P[w+, FRT9-2/18E, par6^{[226]}, P[promPar6_Par6-eGFP, mw]^{61-1f}, P[mw,$
 $pNeurA-H2B-RFP]-1 ; ; P\{w[+mW.hs]=GawB\}pnr^{[md237]}, P[mw, pNeurD-H2B-$
 $RFP]-3-2 / +$
 - **(g) one copy of lgl with Par6-GFP:**
 $Y / w, P[w+, FRT9-2/18E, par6^{[226]}, P[promPar6_Par6-eGFP,$
 $mw]^{61-1f}, P[mw, pNeurA-H2B-RFP]-1 ; lgl^4 P[neo, ry, FRT]40A / + ;$
 $P\{w[+mW.hs]=GawB\}pnr^{[md237]}, P[mw, pNeurD-H2B-RFP]-3-2 / +$

Notes:

$P[mw, UAS-dsRNA baz]$ is baz^{mai} and was obtained from the VDRC (ID2914 GD)

Figure S4:

- **(a) pins^{mai} with GFP-Baz:**
 $Y / w, baz-GFP^{[cc01941]} ; ; P\{w[+mW.hs]=GawB\}pnr^{[md237]}, P[mw, pNeurD-H2B-$
 $RFP]-3-2 / P[mw, UAS-dsRNA pins]$

- **(b) *pins^{rnai}* with Par6-GFP:**
 $Y / w, P[w+, FRT9-2/18E, par6^{[226]}, P[promPar6_Par6-eGFP, mw]^{61-1f}, P[mw, pNeurA-H2B-RFP]-1; ; P\{w[+mW.hs]=GawB\}pnr^{[md237]}, P[mw, pNeurD-H2B-RFP]-3-2 / P[mw, UAS-dsRNA pins]$
- **(c) *Gai* mutant with Par6-GFP:**
 $Y / w, par6^{[226]}, P[promPar6_Par6-eGFP, mw]^{61-1f}, P[mw, pNeurA-H2B-RFP]-1; ; Gai^{57} / Df(BSC374)$
- **(d) *fz^{rnai}* with GFP-Baz:**
 $Y / w, baz-GFP^{[cc01941]}; ; P\{w[+mW.hs]=GawB\}pnr^{[md237]}, P[mw, pNeurD-H2B-RFP]-3- / P[mw, pWiz-dsRNA fz]D2$
- **(e) *sdt^{rnai}* with Par6-GFP:**
 $Y / w, P[w+, FRT9-2/18E, par6^{[226]}, P[promPar6_Par6-eGFP, mw]^{61-1f}, P[mw, pNeurA-H2B-RFP]-1; ; P\{w[+mW.hs]=GawB\}pnr^{[md237]}, P[mw, pNeurD-H2B-RFP]-3-2 / P[y[+], v[+], UAS-dsRNA sdt/attP2$

Notes:

$P[mw, UAS-dsRNA pins]$ is *pins^{rnai}* and was obtained from the VDRC (ID27486 GD)

Gai^{57} was obtained from J. Knoblich

$Df(BSC374)$ deletes *Gai* and was obtained from Bloomington

$P[mw, pWiz-dsRNA fz]D2$ is *fz^{rnai}* and was obtained from D. Strutt

$P[y[+], v[+], UAS-dsRNA sdt/attP2]$ is *sdt^{rnai}* and was obtained from Bloomington (BL-33909)

Figure S5:

same as in Figure 3

Figure S6:

- **(a,h) *kibra^{rnai}* with Par6-GFP:**
 $Y / w, P[w+, FRT9-2/18E, par6^{[226]}, P[promPar6_Par6-eGFP, mw]^{61-1f}, P[mw, pNeurA-H2B-RFP]-1; ; P\{w[+mW.hs]=GawB\}pnr^{[md237]}, P[mw, pNeurD-H2B-RFP]-3-2 / P[y[+], v[+], UAS-dsRNA kibra/attP2$
- **(b,e) *wts^{rnai}* with Par6-GFP:**
 $Y / w, P[w+, FRT9-2/18E, par6^{[226]}, P[promPar6_Par6-eGFP, mw]^{61-1f}, P[mw, pNeurA-H2B-RFP]-1; ; P\{w[+mW.hs]=GawB\}pnr^{[md237]}, P[mw, pNeurD-H2B-RFP]-3-2 / P[y[+], v[+], UAS-dsRNA wts/attP2$
- **(c,f) *hpoRNAi* with Par6-GFP:**
 $Y / w, P[w+, FRT9-2/18E, par6^{[226]}, P[promPar6_Par6-eGFP, mw]^{61-1f}, P[mw,$

pNeurA-H2B-RFP]-1; ; $P\{w[+mW.hs]=GawB\}pnr^{[md237]}$, $P[mw, pNeurD-H2B-RFP]-3-2 / P[y[+], v[+], UAS-dsRNA hpo]attP2$

· (g) *ex^{RNAi}* with Par6-GFP:

$Y / w, P[w+, FRT9-2]18E, par6^{[226]}$, $P[promPar6_Par6-eGFP, mw]^{61-1f}$, $P[mw, pNeurA-H2B-RFP]-1; ; P\{w[+mW.hs]=GawB\}pnr^{[md237]}$, $P[mw, pNeurD-H2B-RFP]-3-2 / w; P[mw, UAS-dsRNA ex]$

Notes:

$P[y[+], v[+], UAS-dsRNA kibra]attP2$ is *kibra^{RNAi}* and was obtained from Bloomington (BL-28683)

$P[y[+], v[+], UAS-dsRNA wts]attP2$ is *wts^{RNAi}* and was obtained from Bloomington (BL-34064)

$P[y[+], v[+], UAS-dsRNA hpo]attP2$ is *hpoRNAi* and was obtained from Bloomington (BL-33614)

Chapitre 4

Résultats supplémentaires

4.1 L'inhibition de *neuralized* favorise l'asymétrie de Par-6

Neuralized (Neur) est une ubiquitin-ligase E3 exprimée spécifiquement dans la SOP. Il s'agit d'un des déterminants cellulaires distribués de manière asymétrique au pôle antérieur de la SOP [Le Borgne and Schweisguth, 2003], et est responsable de l'activation du récepteur Delta dans la SOP et dans la cellule pIIb [Lai et al., 2001] [Pavlopoulos et al., 2001] [Yeh et al., 2001]. Plus récemment, notre laboratoire a mis en évidence le rôle de Neur dans le remodelage de la polarité épithéliale, et plus particulièrement dans l'inhibition du domaine apical de l'épithélium intestinal embryonnaire de drosophile [Chagnet and Schweisguth, 2012]. Puisque l'inhibition de Crumbs favorise la polarisation de la SOP, je me suis demandée si en plus de son rôle dans la signalisation Notch/Delta, Neur pouvait aussi réguler le remodelage de la polarité épithéliale de la SOP. L'enjeu de cette expérience était d'observer des SOP déplétées de Neur, mais dans des conditions proches des cellules sauvages, c'est à dire entourées de cellules épidermales. Or, l'abolition totale de l'expression de *neur* affecte le mécanisme d'inhibition latérale et produit des clones ne contenant que des SOP. Afin d'éviter ce problème, j'ai décidé d'observer la polarisation de Par6-GFP dans un contexte hétérozygote pour *neur^{if}*, ainsi que dans des notums ou une version dominante négative de Neur (*UAS>Neur^{cs}*) est exprimée. Dans ces deux contextes, si les SOP sont plus nombreuses que dans le notum d'un individu sauvage, elles sont toujours isolées (entourées de cellules épidermales). De manière surprenante l'inhibition de *neur* provoque l'augmentation de la polarisation de Par6, et son orientation vers le pôle postérieur est plus précoce (figure 36 b et c). Ainsi, bien que Neur soit impliquée dans le remodelage de la polarité apico-basale dans d'autres épithéliums, elle semble être un inhibiteur de la polarisation de la SOP. Une autre explication serait que l'inhibition

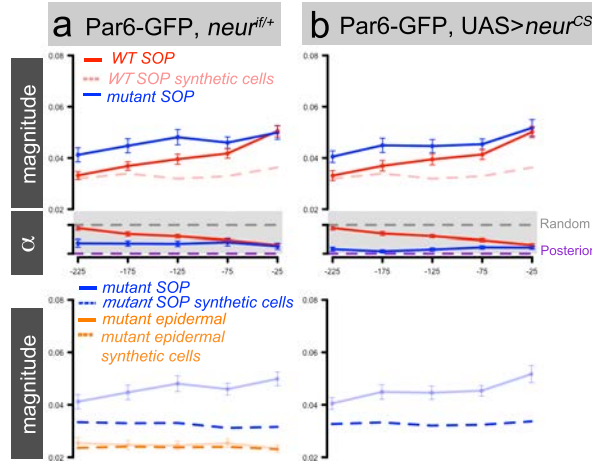


FIGURE 36 – L’inhibition de *neuralized* favorise l’asymétrie de Par-6

(a-b) Profils de polarisation de Par6-GFP, cellules mesurées et synthétiques, pour *neur^{if/+}* (a, 29 SOP et 29 cellules épidermales) et *pnrGAL4, UAS>neur^{CS}*. Seules les SOP furent analysées (b, 36 SOP)

de *neur* provoque une spécification précoce des SOP, due à la diminution de la signalisation Notch. Le programme transcriptionnel spécifique des SOP serait enclenché plus tôt, déclenchant la polarisation précoce de la SOP.

4.2 Le contour des SOP présente une forte intensité de GFP-Baz, Par-6-GFP et aPKC-GFP

En plus de la polarisation de protéines de polarité couplées à la GFP, nous avons analysé leur intensité moyenne de fluorescence au niveau des contours cellulaires. Pour GFP-Baz, Par-6-GFP et aPKC-GFP, l’intensité moyenne mesurée sur le contour des SOP est plus élevée que celle mesurée sur le contour des cellules épidermales (figure 37 a-c). Un résultat similaire est observé pour Baz-GFP (figure 37d). En revanche, bien que la dynamique de Cad-GFP aux jonctions soit différente entre SOP et cellules épidermales, (Figure article 6), et que l’étude comparative des transcriptomes des SOP et des cellules épidermales montre une plus faible expression de E-Cad dans les SOP (Figure article 5), aucune différence de fluorescence n’est observée pour Cad-GFP (figure 37e) entre SOP et cellules épidermales. Ces différences d’intensités observées pour les protéines du complexe PAR, et ce dès 13h30 APF confirment que la régulation de ces trois protéines diffère dans ces deux types de cellules. Le calcul des vecteurs d’intensité est normalisé par l’intensité (cf Annexe A), donc une grande norme de polarisation de dépend pas de l’intensité globale. Je me suis cependant demandée si une grande quantité de Par-6 sur le contour cellulaire pouvait provoquer une forte polarisation, mais aucune corrélation entre

intensité de Par6-GFP et norme de polarisation pour une cellule à un temps donné n'a été observée (Donnée non montrée). Ce type de corrélation n'a pas été testé pour les autres protéines.

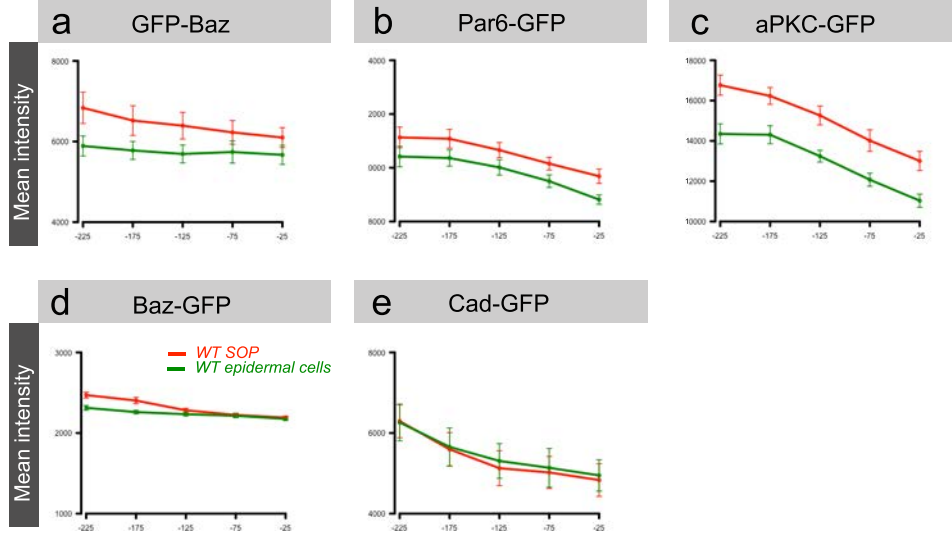


FIGURE 37 – Le contour des SOP présente une forte intensité de GFP-Baz, Par-6-GFP et aPKC-GF

L'intensité moyenne sur le contour des SOP (en rouge) et des cellules épidermales(en vert) fut mesurée pour GFP-Baz (a, 50 SOP et 47 cellules épidermales), Par6-GFP (b, 83 SOP et 78 cellules épidermales), aPKC-GFP (c, 35 SOP et 34 cellules épidermales), Baz-GFP (d, 44 SOP et 42 cellules épidermales) et Cad-GFP (e, 19 SOP et 19 cellules épidermales). Comme pour l'analyse des vecteurs de polarité, la moyenne calculée par bootstrap est affichée (Annexe A), et les barres d'erreurs représentent l'erreur sur la moyenne.

4.3 L'inhibition de la PCP affecte l'intensité moyenne de GFP-Baz, mais pas celle de Par6-GFP

La plupart des génotypes étudiés au cours de cette étude affectent l'intensité moyenne de GFP-Baz et de Par6-GFP, bien souvent en la diminuant (données non montrées). J'ai cependant relevé que l'inhibition de la PCP affecte l'intensité moyenne de GFP-Baz, mais pas celle de Par6-GFP. En effet, l'inhibition de *Vang*, *fmi* et *dsh* ne modifie que très peu l'intensité moyenne de Par6 (figure 38 a-c), alors que l'inhibition de *Vang*, *fmi* et *fz* diminue l'intensité moyenne sur le contour cellulaire de GFP-Baz (figure 38 a'-c'). De plus, la différence d'intensité de GFP-Baz entre SOP et cellules épidermales semble être augmentée dans les contextes *Vang^{mai}* et *fz^{mai}*. La PCP, et plus particulièrement Fz, a été impliquée dans l'endocytose de E-Cad au cours de l'extension de la bande germinale [Warrington et al., 2013]. Il est donc possible que l'effet observée sur Baz soit du à une modification de la régulation des jonctions. Cette analyse nous confirme que la

PCP participe à la régulation de l'accumulation des protéines du complexe PAR sur le contour cellulaire dans le notum, et tout particulièrement celle de Baz.

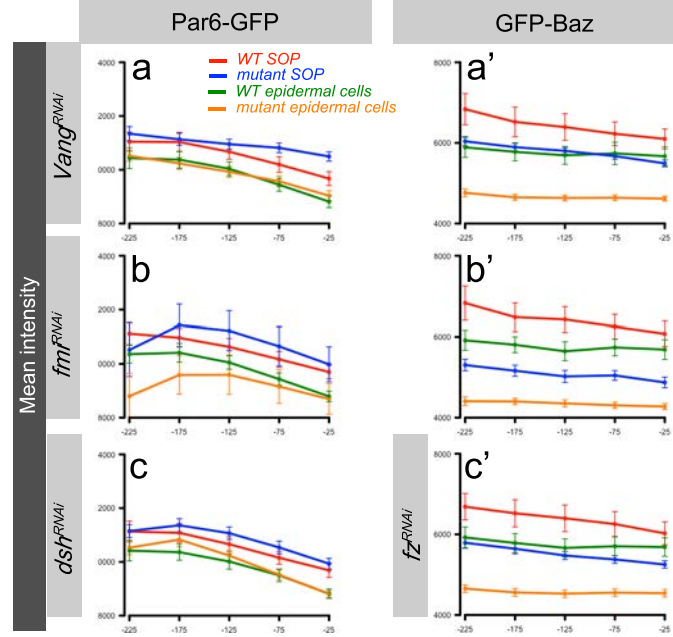


FIGURE 38 – L'inhibition de la PCP affecte l'intensité moyenne de GFP-Baz, mais pas celle de Par6-GFP

L'intensité moyenne sur le contour des SOP (rouge et bleu) et des cellules épidermales (vert et orange) fut mesurée pour Par6-GFP(a-c) et GFP-Baz(a'-c'), dans des contextes *Vang^{RNAi}* (a, 25 SOP et 24 cellules épidermales)(a', 41 SOP et 33 cellules épidermales), *fmi^{RNAi}*(b, 24 SOP et 27 cellules épidermales)(b', 32 SOP et 32 cellules épidermales), *dsh^{RNAi}*(c, 39 SOP et 38 cellules épidermales) et *fz^{RNAi}*(c, 26 SOP et 25 cellules épidermales). Comme pour l'analyse des vecteurs de polarité, la moyenne calculée par bootstrap est affichée (Annexe A), et les barres d'erreurs représentent l'erreur sur la moyenne.

4.4 Les SOP sont capable de se diviser de manière asymétrique à 12h30APF

Sachant que dès 13h30 APF, la polarité apico-basale est déjà régulée de manière différente dans les SOP, je me suis interrogée sur la capacité de ces cellules à accomplir une division asymétrique. Pour tester cette aptitude, j'ai forcé la division des SOP à 12h30 APF, en surexprimant la kinase mitotique String (Stg, Cdc25) dans le système. Les individus analysés exprimaient la protéine Numb couplée à la GFP [Couturier et al., 2013]. Après le choc thermique, les individus furent immédiatement imagés. De nombreuses divisions ont été observées dans le tissu, à un moment du développement ou aucune division n'a lieu chez les individus sauvages, montrant que la surexpression de Stg provoque bien des divisions ectopiques dans le notum. Toutes les divisions de SOP observées au cours de cette expérience montraient une localisation asymétrique de Numb au pôle antérieur

(n=5). En revanche, aucune asymétrie de Numb ne fut observée dans les cellules épidermales (figure 39).

Ainsi, dès 12h30 APF, les SOP sont déjà capable de distribuer Numb de manière asymétrique au cours de la mitose.

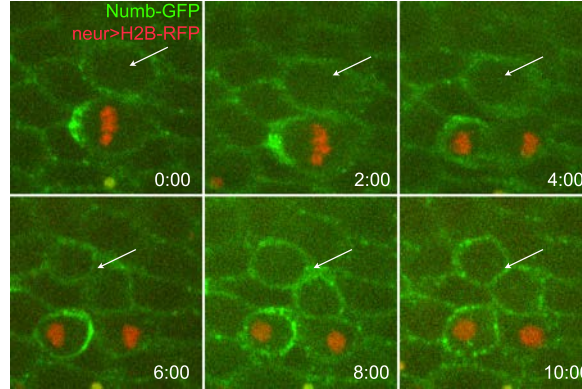


FIGURE 39 – Les SOP sont capable de se diviser de manière asymétrique à 12h30APF

Localisation asymétrique de Numb au pôle antérieur d'une SOP à 12h30 APF. Numb-GFP (en vert) est exprimée sous le contrôle de son propre promoteur, dans un contexte sauvage pour Numb. La SOP est marquée par la construction *neur-H2B-RFP*. Les flèches blanches marquent une cellule épidermale en division. Pour forcer l'entrée en mitose la construction *hs-stg* fut utilisée. Choc thermique de 20 minutes à 36,5 degrés Celsius sur des individus stadés à 12h APF. Le temps est donné en minutes.

Troisième partie

Discussion

Chapitre 1

Conclusion

En étudiant la division asymétrique sous un angle inédit, nous avons mis en évidence différents mécanismes menant à la mise en place de l'axe de polarité lors de la division asymétrique de la SOP :

Suite à une analyse quantitative de la polarisation planaire des SOP, nous avons mis en évidence que l'asymétrie de Baz, Par6 et aPKC n'apparaît pas en mitose, mais en interphase plus d'une heure avant l'arrondissement de la cellule.

Bien que la PCP ne soit pas indispensable à la formation d'un croissant polarisé de Baz en mitose, elle est nécessaire à l'asymétrie des trois membres du complexe PAR dans les SOP en interphase.

L'analyse de la forme des cellules, et de la dynamique de leurs jonctions, ainsi que l'étude de la localisation de Crumbs, montre que la polarité épithéliale des SOP est remaniée en amont de leur division. Lorsque ce remaniement est favorisé, la polarisation des SOP est augmentée.

L'examen des transcriptomes de SOP et des cellules épidermales a révélé l'inhibition d'*ex* et de *p120ctn* spécifiquement dans les SOP. Or, la déplétion d'Ex provoque l'endocytose de Crumbs, et favorise la polarisation des SOP. Similairement, l'absence de p120ctn modifie la dynamique des jonctions de l'épithélium et augmente l'asymétrie de Par-6 et Baz.

Ensemble, ces résultats nous permettent de proposer un modèle de polarisation des SOP : La spécification des SOP entraîne l'expression d'un programme transcriptionnel leur permettant l'acquisition des caractéristiques d'un précurseur proneural. Ce programme permet aussi le remodelage de la polarité épithéliale, en favorisant la formation du complexe PAR. Le complexe PAR ainsi formé interprète la PCP en se localisant au pôle postérieur de la cellule.

Chapitre 2

Perspectives

Les travaux présentés dans cette Thèse ont permis l'élaboration d'un modèle de polarisation de la SOP. En revanche, dans aucune de nos expériences, nous n'avons observé de polarisation des cellules épidermales. Or, notre compréhension de la mise en place de la polarité planaire dans la SOP ne sera complète que lorsque nous parviendrons à déclencher l'asymétrie du complexe PAR dans les cellules épidermales. Notre modèle repose sur deux grand axes : l'inhibition du complexe apical et le remodelage des jonctions, le premier permettant la libération de Par-6-aPKC, le second celle de Baz. Individuellement, induire l'internalisation de Crumbs ou le remodelage des jonctions ne permet pas de polariser les cellules épidermales. Provoquer ces deux phénomènes dans les cellules épidermales pourrait éventuellement initier cette polarisation. Cependant, pour appréhender tous les mécanismes menant à la division asymétrique d'une cellule épithéliale, plusieurs axes pourraient être développés.

2.1 Quand la SOP acquière-t-elle le potentiel de se diviser asymétriquement ?

Dans notre modèle de polarisation de la SOP, nous proposons qu'un programme transcriptionnel induit le remodelage de la polarité apico-basale, conduisant à la polarisation. Or, ce sont les facteurs de transcription Achaete et Scute (ou facteurs proneuraux) qui confèrent à la SOP son identité. Au cours de mon introduction, j'ai évoqué le mécanisme d'inhibition latérale menant à la spécification de la SOP. Ainsi, les cellules du cluster proneural (PNC) expriment ces facteurs proneuraux et leur expression sera simplement réduite à la SOP après sa sélection [Cubas et al., 1991] [Heitzler and Simpson, 1991]. Si, comme le propose notre modèle, l'expression des gènes cibles des facteurs proneuraux est suffisante à la mise en place d'une polarité planaire dans une cellule du notum, il est

possible qu'au cours de l'inhibition latérale, les cellules du PNC soient capables de se polariser. Les cellules du PNC non-SOP perdront ensuite cette aptitude quand l'expression des facteurs proneuraux sera réduite à la SOP.

Notre analyse de l'asymétrie des protéines du complexe PAR repose sur la comparaison de la norme des vecteurs mesurés et de la norme des vecteurs des cellules synthétiques. Or, si la polarisation apparaît 1h30 avant la division, nous observons, dès 13h30 APF une différence entre les cellules synthétiques SOP et épidermales. Les cellules synthétiques étant construites à partir des contours cellulaires réels, cette différence reflète une disparité de l'organisation de Baz, Par-6 et aPKC sur les contours cellulaires des SOP et des cellules épidermales. Ce résultat, associé à la différence d'intensité moyenne au contour de ces mêmes protéines dans les deux types cellulaires confirme que la régulation des protéines du complexe PAR est différente dans les SOP et les non-SOP avant 13h30 APF. Mais quand est-il des cellules du PNC ? Malheureusement, si nous avons pris soin de n'étudier que des cellules épidermales non-voisines des SOP, nous ne pouvions pas distinguer les cellules épidermales ayant appartenu au PNC de celles n'ayant jamais exprimé les facteurs proneuraux. Il est donc probable que notre échantillon de cellules épidermales contienne ces deux types de cellules.

Aucun des géotypes étudiés n'a annulé la différence entre les cellules synthétiques SOP et épidermales, impliquant que nous ne comprenons toujours pas les premières étapes du réarrangement de la polarité apico-basale des SOP. De plus, si les SOP peuvent se diviser de manière asymétrique à 12h30 APF, aucune cellule épidermale n'a cette aptitude (voir le chapitre "résultats supplémentaires"). Ainsi, si les cellules du PNC eurent la capacité de se polariser, cette aptitude est déjà perdue à 12h30 APF. Pour découvrir les mécanismes donnant au SOPs leur capacité à se diviser de manière asymétrique, il faudrait remonter aux prémices de la spécification de la SOP, le cluster proneural. Les mouvements de la pupes à 10h APF rendent difficile l'analyse de la polarité épithéliale dans les PNC dont les microchaetes sont issues. Cependant, étudier les PNC des macrochaetes dans les disques d'ailes paraît abordable. Le seul inconvénient est que même si les disques d'ailes peuvent être analysés sans fixation, nous ne pourrions suivre l'évolution des protéines du complexe PAR que pendant quelques minutes.

2.2 Mieux comprendre la dynamique de la polarisation.

Dans l'analyse de la polarisation de Baz, Par-6 et aPKC, nous avons étudié la dynamique de la moyenne de tous les vecteurs. En effet, les vecteurs de polarité individuels

étaient extrêmement chaotiques, au point qu'aucune tendance claire pouvait être décelée. Cette évolution chaotique des vecteurs de polarisation au cours du temps pourrait être due au signal provenant des cellules voisines. En effet, la fluorescence mesurée aux contours cellulaires provient à la fois de la cellule analysée, mais aussi des cellules adjacentes. Ainsi, toutes les polarisations mesurées dans cette étude sont tamponnées par les signaux provenant des cellules voisines. De plus, lorsque les cellules du notum s'arrondissent avant de se diviser, une nette augmentation de fluorescence est observée au niveau de leur contour cellulaire, et ce pour toutes les protéines observées au cours de notre analyse. Si nous n'avons pas étudié la distribution de fluorescence lors de l'arrondissement des cellules, le calcul du vecteur de polarité sera modifié lors de l'arrondissement d'une cellule voisine. Enfin, lorsque nous observons la localisation de nos protéines d'intérêt dans le notum, quelques agrégats temporaires de protéines fluorescentes sont visibles sur le contour cellulaire. Ces agrégats pourraient aussi transitoirement "tirer" les vecteurs de polarité sur quelques point de temps, avant de disparaître. Ainsi, l'aspect chaotique des vecteurs de polarité à l'échelle de la cellule unique pourrait être expliqué à la fois par le signal provenant des cellules voisines, mais également par la formation d'agrégats éphémères de protéines.

Nous avons donc analysé la tendance générale de la polarisation des SOP, mais nous ne savons rien de la dynamique de la polarisation d'une SOP unique. Il est possible que la polarisation de Baz, Par-6 et aPKC dans chaque cellule suive la même dynamique que celle observée en moyenne, mais il est aussi envisageable que les profils de polarisation individuels soient très différents. Dans le zygote du *C.elegans*, le flux d'acto-myosine provoque une transition rapide entre l'état "non polarisé" et l'état "polarisé" [Motegi and Seydoux, 2013]. Si aucun flux d'acto-myosine n'a été observé dans la SOP, nous ne pouvons exclure que la polarisation apparaisse suite à une transition brutale. L'aspect continu de la courbe moyenne ne serait due qu'au fait que toutes les SOP ne subissent pas cette transition en même temps, mais de manière aléatoire dans les 125 minutes précédant la division.

Si nous ne pouvons exclure les agrégats de protéines de notre analyse, nous pourrions éliminer le problème de la fluorescence des cellules voisines en n'exprimant les protéines fluorescentes dans des cellules uniques. Tout l'enjeu de cette expérience réside dans le fait que ces protéines doivent être exprimées à un niveau endogène, rendant impossible toute expérience de sur-expression. De plus, l'expression de la protéine fluorescente doit être déclenchée suffisamment tôt pour que son niveau d'expression soit proche de celle d'une protéine sauvage, et suffisamment tard pour son expression reste cantonnée à une cellule unique. Bien que techniquement difficile, l'analyse de la polarisation de Baz, Par-6 et

aPKC en cellule unique nous donnerait de nombreuses informations quant à la dynamique de leur polarisation, et sur les mécanismes associés.

2.3 La formation du complexe PAR, et son rôle dans la mise en place de l'asymétrie

Notre modèle propose que la formation du complexe PAR soit l'élément déclencheur de l'apparition de l'asymétrie. En effet, seul le complexe PAR serait capable d'interpréter la PCP. Dans cette partie, je reviens sur les résultats qui ont façonné cette partie du modèle.

2.3.1 Polarité épithéliale du notum et formation du complexe PAR

Notre modèle sous-entend que les cellules du notum ont une polarité apico-basale organisée en trois domaines, où Par-6 et aPKC sont recrutées au pôle apical, et Baz aux jonctions. Si ce modèle de polarité épithéliale fut montré dans trois épithélium de *Drosophile* [Harris and Peifer, 2005] [Walther and Pichaud, 2010] [Morais-de Sá et al., 2010], une telle séparation de Par-6-aPKC et de Baz n'a pas été observée dans d'autres épithéliums, ou dans d'autres organismes.

Sur tissu fixé comme sur tissu vivant, il est difficile d'obtenir une bonne résolution de l'axe apico-basal du notum. La simple observation de Bazooka et de Par-6-aPKC sur ce plan n'est donc pas envisageable. Cependant, allant dans le sens d'une organisation en trois domaines, si le signal de Par6-GFP au domaine subapical ressemble beaucoup à celui d'aPKC-GFP, le signal de Baz-GFP ou de GFP-Baz est différent. La fluorescence de Par-6 et aPKC au domaine subapical est floue et en pointillés, et un signal est visible dans la région apicale (hors contour) des cellules en interphases. Le signal des constructions Bazooka couplées à la GFP est beaucoup plus net au niveau des contours cellulaires, et aucune accumulation de Baz n'est observée dans la région apicale. De plus, cette localisation de Baz sur le contour est comparable à la localisation de E-Cad-GFP aux jonctions du notum.

Nous avons montré que la polarisation des SOP en interphase nécessite la présence des trois protéines du complexe PAR (Figure 3). En revanche, nous ne savons pas si la polarisation de l'une dépend de la polarisation des autres. En effet, nous avons étudié la polarisation de chaque protéine indépendamment de celle des autres, dans des cellules

différentes. De plus, seule Baz présente une polarisation orientée vers le pôle postérieur à 13h30 APF, sous-entendant que sa polarisation serait plus précoce de celle de Par-6 et aPKC. Ainsi, des mécanismes différents régulent peut-être la polarisation précoce de Bazooka, et la polarisation précoce de Par-6 et aPKC.

Pour répondre à toutes ces questions, il nous faudrait étudier dans un même notum et dans les mêmes cellules la localisation et la polarisation de Par-6 et de Baz. L'une serait couplée à la GFP, et l'autre à la RFP. Leur simple expression dans le notum pourrait répondre à la question de l'organisation de l'épithélium en trois domaines. En revanche, pour savoir si la polarisation de Baz est effectivement plus précoce que celle de Par-6-aPKC à l'échelle de la cellule, les deux protéines fluorescentes devraient être exprimées dans une cellule unique.

Une autre possibilité serait d'étudier simultanément la formation du complexe PAR et sa polarisation en utilisant la technologie FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*). En effet, il est aujourd'hui relativement simple de produire des protéines de fusion, notamment suite à l'avènement de la méthode CRISPR [Jinek et al., 2012]. De plus, la technologie FRET est maintenant utilisée avec succès dans l'étude des récepteurs couplés aux protéines G [Persani et al., 2007]. Nous avons donc les outils techniques nécessaires pour construire des protéines de fusion, et les connaissances nécessaires quant aux sondes fluorescentes à utiliser.

2.3.2 Le trafic de Crumbs et de E-Cad par le Retromer favorise la formation du complexe PAR ?

Nous avons analysé la polarisation de Baz et de Par-6 dans différents contextes affectant Crumbs. Trois de ces contextes provoquent la déplétion de la protéine (clones mutants *crb*, *crb^{rai}*, ou encore en inhibant le Retromer avant *vps35^{rai}*). Dans ces géotypes, les polarisations de Baz et Par-6 sont augmentées, et l'orientation de Par-6 en direction du pôle postérieur est plus précoce que dans les individus sauvages. En revanche, l'orientation de Baz est similaire à celle des individus contrôles. Lors de l'inhibition d'*ex*, la polarisation de Baz est augmentée de manière similaire, mais elle s'oriente beaucoup plus tôt vers le pôle postérieur. Ce résultat laisse penser que l'activation de l'internalisation de Crumbs induit une orientation plus précoce de Baz qu'une simple déplétion de la protéine. Nous avons également montré que l'inhibition du Retromer (*vps35^{rai}*) inhibe l'accumulation au domaine apical (hors contour) de Crumbs. Ainsi, il est probable que la relocalisation au domaine apical de Crumbs observée spécifiquement dans les SOP soit due à son trafic par le Retromer.

Nous avons évoqué le rôle de p120ctn dans le remodelage des jonctions des SOPs. Or, l'inhibition de p120ctn promeut l'internalisation des Cadhérines chez les mammifères et E-Cad est un potentiel cargo du Retromer. [Lohia et al., 2012]. Dans notre modèle de polarisation, nous proposons que l'internalisation de Crumbs libère Par-6-aPKC, et que le remodelage des jonctions libère Baz. Une autre possibilité est que Crumbs et E-Cad soient internalisées, mais que Par-6-aPKC et Baz restent associées respectivement à Crumbs et E-Cad (via la β -caténine). Ainsi, les complexes Crumbs-Par-6-aPKC et E-Cad- β cat-Baz se retrouveraient dans des vésicules intracellulaires après leur transport par le Retromer. Ainsi, le transport de Crumbs par le Retromer permettrait la formation du complexe PAR en favorisant le rapprochement de Baz, Par-6 et aPKC dans des vésicules intracellulaires. Ce modèle expliquerait la différence de phénotypes entre les contextes où Crumbs est déplétée, et l'inhibition d'*ex*, où l'endocytose de Crumbs est favorisée.

Afin de mieux comprendre les mécanismes intracellulaires sous-tendant la formation du complexe PAR, il faudrait, en plus d'analyser la localisation de la formation du complexe (par FRET), caractériser les protéines Crumbs relocalisées au domaine apical dans la SOP. Nous pourrions dans un premier temps tester si ces protéines sont associées à la membrane, ou si elles sont accumulées dans des vésicules intracellulaires. Une autre possibilité est que Crumbs soit relocalisée au domaine apical lors de la formation de l'ARS (*Actin Rich Structure*). L'ARS est une structure riche en actine se formant au domaine apical à l'interface entre les cellules filles de la SOP. Le rôle proposé de cette structure est de favoriser la signalisation Delta/Notch entre les deux cellules filles [Rajan et al., 2009]. Le domaine intracellulaire de Crumbs se liant à la moesin [Médina et al., 2002], il n'est pas impossible que Crumbs soit recrutée au domaine lors de la formation de cette ARS.

2.3.3 Analyse de la mobilité de Bazooka aux jonctions

Nous avons analysé la dynamique de Baz, Par-6, aPKC et de E-Cad au niveau des contours cellulaires par FRAP, et observé des différences entre SOP et cellules épidermales. Les courbes de recouvrement sont normalisées par l'intensité initiale des jonctions, nous permettant de comparer le pourcentage de recouvrement entre les deux types de cellules. Une autre méthode, décrite dans [Bulgakova et al., 2013], détermine ces mêmes pourcentages de recouvrement, mais les ramène à la mesure initiale de fluorescence. Cette technique permet la comparaison des quantités de protéines présentes dans les fractions mobiles et immobiles entre deux jonctions ayant une intensité de fluorescence initiale différente.

Sachant que l'intensité de Baz, Par6 et aPKC est plus grande dans les SOP que dans les cellules épidermiques, nous pourrions utiliser cette méthode pour comparer les quantités de protéines mobiles et immobiles des deux types cellulaires. Quelques informations supplémentaires pourraient ainsi être tirées des expériences de FRAP. Nous pourrions par exemple savoir si seule la quantité de protéines associée à la fraction mobile de Baz est augmentée dans les SOP, ou si la fraction immobile est aussi affectée (Figure 40).

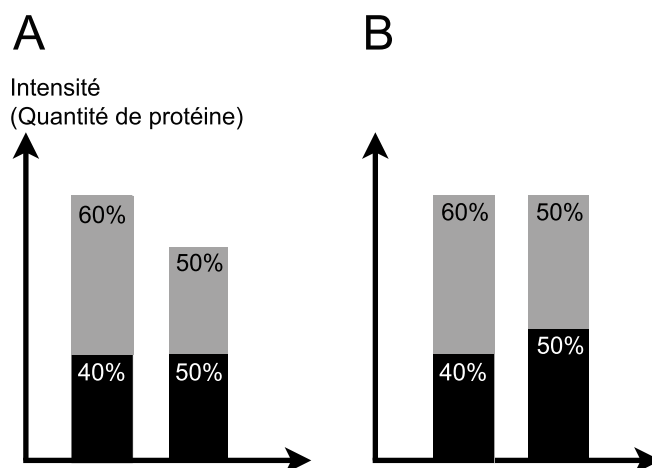


FIGURE 40 – Etudes des fractions mobiles et immobiles. La fraction mobile est représentée en gris, la fraction immobile en noire.

A. Cas de deux jonctions d'intensité différentes. Les pourcentages de protéines mobiles et immobiles diffèrent, mais la quantité de protéines associée à la fraction immobile est identique.

B. Cas de deux jonctions d'intensité identique. Les pourcentages de protéines mobiles et immobiles diffèrent, tout comme la quantité de protéines associée aux fractions mobiles et immobiles.

De même, si la fraction mobile de Baz correspond bien à la protéine en complexe avec Par-6 et aPKC, l'inhibition de *par-6* pourrait affecter la composition des jonctions de deux manières différentes. Première possibilité, l'inhibition de *par-6* diminue la fraction mobile de Baz, mais n'augmente pas la fraction immobile, signifiant qu'il n'existe pas de compétition entre Par-6 et les jonctions pour le recrutement de Baz à la membrane. Deuxième possibilité, une augmentation de la fraction immobile de Baz est observée, montrant qu'une telle compétition existe.

Lors de l'ajustement de la courbe de recouvrement à une équation à deux paramètres (cf annexe C), il nous est possible de distinguer un pourcentage de protéines à recouvrement rapide, et un pourcentage de protéines à recouvrement lent. L'analyse de ces deux pourcentages et de leur évolution en fonction des génotypes étudiés pourra aussi nous donner de nombreuses informations quand aux mécanismes cellulaires impliqués dans le recouvrement.

2.4 Comment le complexe PAR interprète-t-il la PCP ?

Nous avons montré que l'inhibition de la PCP abolit toute asymétrie en interphase, confirmant l'observation faite par [Bellaïche et al., 2001] (Figure 33). En revanche, nous ne comprenons pas par quels mécanismes le complexe PAR interprète cette PCP. Plusieurs études montrent des interactions directes entre les membres de la polarité apico-basale et la PCP : Fz interagit directement avec PatJ, aPKC peut inhiber l'activité Fz en le phosphorylant [Djiane et al., 2005], et Scrib se lie à Vang [Courbard et al., 2009]. La polarité apico-basale et la PCP ne sont donc pas deux entités distinctes.

Dans une étude du laboratoire de 2004 [Bellaïche et al., 2004], la localisation de Fz couplée à la GFP et exprimée sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire (promoteur de la β -cat) est étudiée dans le notum. L'accumulation de Fz au pôle postérieur des SOP est plus forte que dans les cellules épidermales. De plus, lorsque les jonctions postérieures des cellules du notum sont photoblanchies, le recouvrement semble beaucoup plus rapide dans les SOP que dans les cellules épidermales. Si cette différence entre les deux types cellulaires n'est pas due au promoteur ubiquitaire régulant l'expression de Fz-GFP, cette observation laisse penser que la régulation de la PCP elle-même diffère entre SOP et cellules épidermales. Ainsi, le complexe PAR pourrait-être capable d'interpréter la PCP dans la SOP, parce que celle-ci a atteint un niveau requis d'activation. En revanche, ce niveau limite d'activation n'est pas atteint dans les cellules épidermales, c'est pourquoi le complexe PAR ne peut y être asymétrique. Fz, ayant été impliquée dans l'endocytose de E-Cad au cours de l'extension de la bande germinale [Warrington et al., 2013], il est possible que le "niveau d'activation" de la PCP puisse se traduire par le niveau de remodelage des jonctions.

Il est aussi possible qu'une boucle de rétrocontrôle positif soit mise en place entre le complexe PAR et la PCP. Dans l'étude de [Djiane et al., 2005], un modèle de contrôle de Fz par aPKC et Baz est proposé. PatJ, associée à aPKC en l'absence de Baz se lie à Fz. aPKC phosphoryle alors Fz et l'inhibe. Baz, en inhibant l'association d'aPKC à PatJ, réduit la phosphorylation de Fz dépendante d'aPKC et permet la stabilisation de Fz. Ce modèle, transposé dans notre système pourrait expliquer la polarisation du complexe PAR. En effet, dans les cellules épidermales, aPKC et Par-6 sont associées au complexe apical et, par l'intermédiaire de PatJ, aPKC pourraient réduire l'activité de Fz. Dans les SOP, le remodelage de la polarité apico-basale, et l'inhibition du complexe apical provoque la formation du complexe PAR. L'interaction d'aPKC avec PatJ serait alors abolie, et aPKC n'inhiberait plus Fz. Ainsi, la formation du complexe PAR déclencherait l'augmentation de la signalisation PCP dans la SOP, déclenchant l'asymétrie du complexe PAR.

Cependant, ces hypothèses n'expliquent pas les mécanismes d'ancrage du complexe PAR au pôle postérieur. Aucune interaction directe entre les membres de la PCP et Par-6, aPKC ou Baz n'a été mise en évidence. En revanche, l'inhibition de la PCP a un effet sur l'intensité de GFP-Baz, mais pas sur celle de Par6-GFP, laissant penser que la PCP agit sur la polarisation du complexe PAR *via* Baz. Même s'il est admis que la PCP transmet l'information d'orientation aux cellules grâce à la localisation asymétrique de ses composants, il existe vraisemblablement des cibles intracellulaires. Ces cibles sont aujourd'hui encore inconnues. Ainsi, si les protéines de la PCP ne recrutent pas le complexe PAR directement au pôle postérieur, c'est certainement une de leurs protéines cibles qui régit leur polarisation. Toute avancée dans la compréhension des mécanismes intracellulaires de la PCP nous donnera des pistes quand à l'asymétrie du complexe PAR dans la SOP.

2.5 L'entrée en mitose et la colonisation du domaine latéral.

2.5.1 La colonisation du domaine latéral

Lors de l'entrée en mitose, le complexe PAR envahit le domaine latéral. Si des études antérieures ont identifié les rôles de Dlg et de la kinase mitotique aurA dans ce mécanisme [Bellaïche et al., 2001] , [Wirtz-Peitz et al., 2008], aucun des géotypes étudiés dans ce travail de thèse n'a provoqué la colonisation précoce du domaine latéral. Ce mécanisme est donc très probablement régulé par les kinases mitotiques lors de l'entrée en mitose.

Des candidats intéressants pour ce mécanisme sont la kinase Par-1 et sa phosphatase PP2A [Ogawa et al., 2009] [Chabu and Doe, 2009] [Krahn et al., 2009] [Wang et al., 2009]. En effet, Par-1 inhibe la localisation de Baz au domaine latéral en la phosphorylant sur deux serines différentes. La première, S151, est proche du domaine d'oligomérisation de Baz, et la seconde, S1085, est proche du site de phosphorylation et de liaison d'aPKC. Les versions non-phosphorylables de Baz pour ces sites colonisent le domaine latéral [Benton et al., 2002]. Ainsi, l'activation de PP2A en début de mitose pourrait provoquer la déphosphorylation de ces sites et la localisation du complexe PAR le long du domaine latéral.

De plus, la phosphorylation de Bazooka par Par-1 induit le recrutement de la protéine 14-3-3 sur les serines phosphorylées. L'encombrement provoqué par cette fixation empêche l'oligomérisation de Baz (pour la S151) et la fixation d'aPKC (pour la S1085) [Benton et al., 2002]. Ainsi, Par-1 est aussi capable d'inhiber la formation du complexe PAR en inhibant la liaison Baz-aPKC. Dans mon introduction, j'ai évoqué l'importance du

domaine d'oligomérisation de Baz dans l'asymétrie des neuroblastes. Il n'est pas exclu que ce domaine soit aussi important pour la polarisation de la SOP, soutenant l'importance de réguler la phosphorylation de Baz par Par-1 dans cette cellule.

2.5.2 Les protéines du domaine basal

Au cours de cette étude, nous nous sommes focalisés sur la régulation des protéines du complexe PAR par les protéines apicales. Cependant, il n'est pas exclu que les protéines latérales aient aussi un rôle dans la polarisation de la SOP. Nous venons de discuter du rôle potentiel de PP2A en mitose, mais le rôle de Par-1 et de 14-3-3 dans l'inhibition de l'interaction Baz-aPKC soulève aussi l'importance de réguler l'activité kinase de Par-1 en interphase. Notons également que plusieurs études ont identifié la protéine latérale Scrib comme régulatrice du transport rétrograde par le Retromer [de Vreede et al., 2014] [Lohia et al., 2012]. Il est donc possible que la relocalisation de Crumbs dans la SOP soit liée à la régulation de Scrib.

Dans le modèle de formation du complexe PAR proposé par [Wirtz-Peitz et al., 2008], Lgl tamponne la formation du complexe PAR jusqu'à l'activation de la kinase mitotique aurA. Une fois la mitose entamée, Lgl serait exclue du complexe Par-6-aPKC-Lgl, et céderait progressivement sa place à Baz. Ce modèle n'est pas incompatible avec le notre, puisque l'inhibition de *lgl* favorise la polarisation de Par-6 en interphase (cf le chapitre "résultats supplémentaires"), probablement suite à l'augmentation de la formation du complexe PAR.

Conclusion générale

La division de la SOP est classiquement décrite comme une division asymétrique intrinsèque, sous-entendant que les destins cellulaires des cellules filles ne dépendent pas de la signalisation extérieure, mais de la mise en place d'un axe de polarité au sein de la cellule mère. Notre modèle de polarisation ne contredit pas cette définition, dans le sens où un programme transcriptionnel spécifique de la cellule rend possible la mise en place d'un axe de polarité. Cependant, la polarisation de la SOP en interphase requiert la signalisation PCP, présente dans tout le tissu.

Au cours des dernières années, de nombreuses équipes se sont intéressées à l'homéostasie de l'épithélium intestinal de la Drosophile. Tout comme ce qui est proposé chez les mammifères, les cellules souches intestinales répondraient aux signaux envoyés par les cellules de l'épithélium pour déclencher leurs divisions, et générer différents types de cellules

filles [Jiang and Edgar, 2012]. Cependant, une étude a mis en évidence la présence d'une localisation asymétrique de Baz pendant les divisions asymétriques des cellules souches intestinales de la *Drosophile*. Cette étude propose que le complexe PAR est distribué de manière asymétrique, et que l'asymétrie de l'activité aPKC joue sur la signalisation Notch dans ce système, et donc sur la différenciation des deux cellules filles [Goulas et al., 2012]. Ici encore, la définition de division asymétrique intrinsèque ou extrinsèque devient floue.

S'il existe un programme transcriptionnel capable d'induire la polarisation de la SOP, nous oublions bien souvent que cette cellule fait partie intégrante d'une unité beaucoup plus large, un épithélium. Les épithéliums peuvent être souples et permettre le réarrangement de leur polarité, mais peuvent également constituer une barrière extrêmement solide, contrôlant strictement les échanges entre deux milieux. Ces épithéliums sont aussi des entités dynamiques dont les caractéristiques peuvent changer dans le temps, particulièrement au cours du Développement. Si la signalisation PCP dans le notum est requise dans la polarisation des SOP, d'autres caractéristiques de cet épithélium pourraient avoir leur importance.

Annexes

Annexe A

Calcul des vecteurs de polarisation

Co-écrit par Hervé Rouault

Dans notre analyse de la polarisation des SOP, nous étudions l'évolution au cours du temps de la moyenne des vecteurs de polarité pour un génotype donné. Dans cette annexe, je décris les différentes étapes menant à ces moyennes, de l'extraction des coordonnées du contour des cellules à l'estimation de la moyenne en utilisant une technique de bootstrap.

Coordonnées du contour des cellules

Pour chaque cellule, les coordonnées du "contour", c'est à dire la région apicale où se localisent Par6, Baz, aPKC ou Crumbs sont relevées. Ces coordonnées sont extraites grâce à un plugin FIJI nommé "JFilament" (pour plus d'informations, consulter le site <http://athena.physics.lehigh.edu/jfilament/>). Ce plugin permet la création d'une bande, appelée *snake*, recouvrant le contour de la cellule.

Chaque film est ouvert avec JFilament, et un *snake* est manuellement placé sur le contour de la cellule à analyser au temps zéro. Ensuite, le plugin l'optimise de façon à maximiser l'intensité de ses pixels sans toutefois qu'il ne présente une trop forte courbure locale (Figures 41 A-B et 42 a-b). Pour extraire les coordonnées du contour à chaque point de temps, JFilament reporte sur chaque image le *snake* de l'image précédente, et le réadapte si la forme de la cellule a changé entre les deux images. Selon les génotypes, et selon les mouvements de la pupe lors de l'acquisition, JFilament ne parvient pas toujours à aligner le *snake* sur le contour. Une correction manuelle est alors effectuée. Notons toutefois que pour une cellule donnée et grâce au processus d'optimisation, les *snakes* obtenus *in fine* ne dépendent pas de leur initialisation manuelle. C'est seulement lorsque le contour initial dévie fortement du contour réel de la cellule que ce processus d'optimisation échoue.

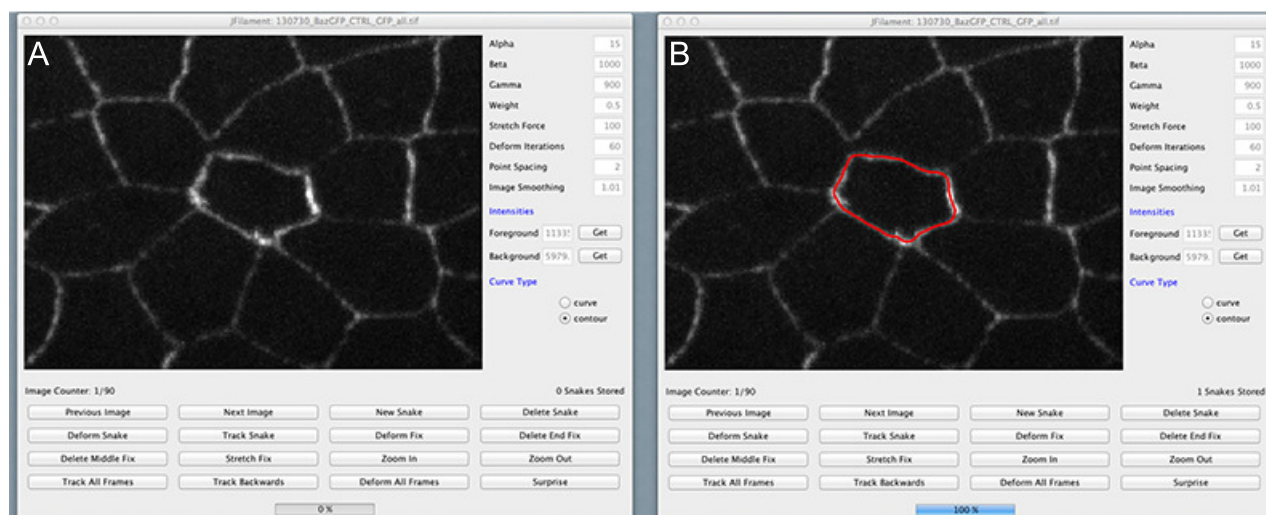


FIGURE 41 – Les contours des cellules sont relevés grâce au plugin FIJI "JFilament"

A. Après ouverture de l'image avec JFilament, nous sélectionnons la cellule à suivre au cours du temps.
B Le programme détermine le contour de la cellule, et trace un *snake* passant par les pixels de forte intensité. L'opération est répétée à chaque point de temps.

Cette opération est répétée pour toutes les cellules à analyser du film, et un fichier texte est finalement créé, répertoriant les pixels sélectionnés comme faisant parti du contour. Plus précisément, nous obtenons une liste de coordonnées, donnant la position de chaque pixel du contour. C'est à partir de cette liste de coordonnées de pixels que nous travaillons pour obtenir un vecteur de polarité.

Extraction des intensités des contours et calcul du vecteur de polarité.

Hervé Rouault (ancien post-doctorant du laboratoire) a entièrement élaboré et codé en langage *python* le calcul du vecteur de polarité, dont les différentes étapes sont décrites dans cette partie. J'ai ensuite complété ce programme pour que ces calculs soient réitérés pour chaque cellule et à chaque points de temps. Le vecteur de polarité est donc calculé pour chaque cellule et à chaque temps, à partir de la liste de pixel établie.

Extraction des intensités.

Les pixels dont les coordonnées sont extraites par JFilament ne forment pas une boucle continue (Figure 42 c). Ils constituent uniquement les sommets des polygones définissant les contours. Nous avons configurés les *snake* tels que ces sommets soient distants de

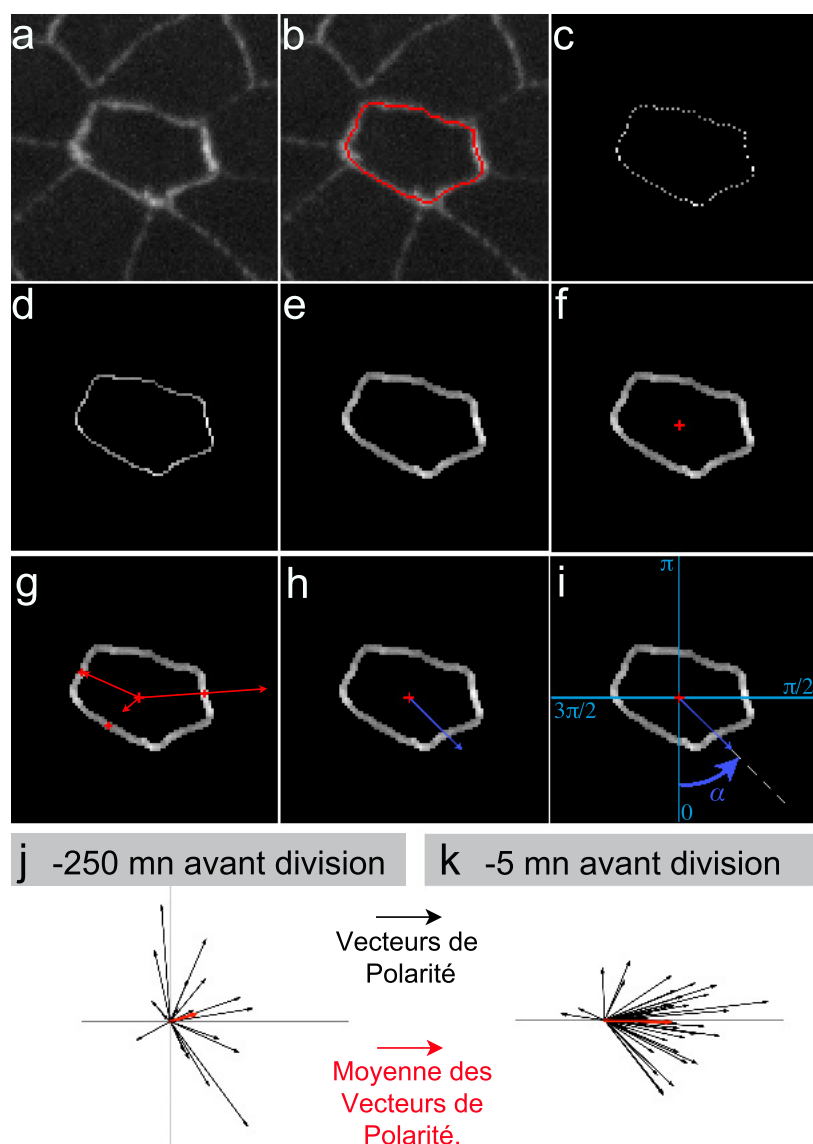


FIGURE 42 – Calcul du vecteur de polarité : les différentes étapes.

a. Selection de la cellule à analyser. **b.** Le contour de la cellule est déterminé avec le plugin JFilament. **c.** Selection des pixels retenus par JFilament. **d.** Ajout des pixels manquants pour faire un contour continu. **e.** Le contour de la cellule est "agrandi" et aura trois pixels de largeur. **f.** Le barycentre de la forme obtenue est calculé. **g.** pour chaque pixel du contour, un vecteur d'intensité est calculé. La longueur du vecteur est proportionnelle à la valeur de l'intensité du pixel. Pour simplifier la représentation, seuls les vecteurs de trois pixels sont tracés ici. **h.** A partir des vecteur d'intensité, un vecteur moyen de polarité est calculé. Le calcul de ce vecteur est normalisé par l'intensité globale de la cellule. **i.** L'orientation α du vecteur de polarité dans le plan est calculé. Un vecteur orienté vers le pôle postérieur aura une valeur α proche de $\pi/2$, alors qu'un vecteur orienté vers le pôle antérieur aura une valeur proche de $3\pi/2$. **j-k.** Observation des vecteurs de polarité de GFP-Baz des SOPs sauvages. Les flèches noires représentent les vecteurs de polarité de chaque cellule. La flèche rouge représente la moyenne de tous les vecteurs de polarité à un temps donné. **j.** 250 minutes avant la division. **k.** 5 minutes avant la division.

trois pixels. Il manque donc deux pixels entre chaque sommet. Nous les ajoutons aux coordonnées des pixels de façon à obtenir une boucle continue (Figure 42 d). Si \mathbf{r}_i et \mathbf{r}_{i+1} sont deux sommets consécutifs, nous ajoutons les coordonnées $1/3\mathbf{r}_i + 2/3\mathbf{r}_{i+1}$ et $2/3\mathbf{r}_i + 1/3\mathbf{r}_{i+1}$. La bande ainsi obtenue n'est large que d'un pixel, ce qui n'est pas représentatif de la largeur du signal apical de nos protéines d'intérêts (Cf GFP-Baz Figure 42 a). Nous ajoutons donc à la liste les pixels voisins, de façon à obtenir une bande large de trois pixels (Figure 42 e) en convoluant les pixels précédents par le noyau :

$$K = \begin{pmatrix} 0 & 1 & 0 \\ 1 & 1 & 1 \\ 0 & 1 & 0 \end{pmatrix} \quad (\text{A.1})$$

Enfin, l'intensité associée à chaque pixel de cette liste est extraite. Nous obtenons alors une liste de coordonnées, chacune associée à une valeur d'intensité. C'est avec cette liste que sera calculé le vecteur d'intensité.

Calcul du vecteur de polarité

Nous définissons le vecteur de polarité par analogie au moment dipolaire en électrostatique comme :

$$\mathbf{p} = \sum_{i \in \mathcal{C}} I_i (\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_0) \quad (\text{A.2})$$

où \mathcal{C} est l'ensemble des indices des pixels du contour, I_i l'intensité du pixel i et \mathbf{r}_i la position du pixel i . \mathbf{r}_0 est le barycentre de ces pixels :

$$\mathbf{r}_0 = \frac{1}{|\mathcal{C}|} \sum_{i \in \mathcal{C}} \mathbf{r}_i \quad (\text{A.3})$$

Plus familièrement, le barycentre de la cellule est déterminé, tel que les coordonnées de ce barycentre sont les moyennes des abscisses et des ordonnées des pixels du contour (Figure 42f et Equation A.3). A chaque pixel peut être associé un vecteur d'intensité, dont la norme dépend de l'intensité du pixel, (Figure 42 g). La base du calcul du vecteur de polarité (Equation A.2) correspond à la somme des vecteurs d'intensité de chaque pixel (Figure 42 h et Equation A.2)

On peut vérifier aisément que le vecteur polarité ainsi défini est invariant par changement d'origine à la fois des positions et des intensités. En outre, ce vecteur polarité pointe bien dans la direction des fortes intensités et est nulle pour une intensité uniforme sur le contour.

Le but des analyses conduites ici implique la comparaison des polarisations de différentes espèces moléculaires sur des cellules dont la taille et la forme varient d'un échantillon à l'autre. En particulier, l'expression des protéines marquées et leur détection pourra varier et donner des échelles d'intensités mesurées grandement différentes. Il convient donc de normaliser correctement ces vecteurs. Nous aimerions par exemple obtenir un vecteur dont la norme est comprise entre 0 et 1, la valeur 1 étant obtenue lorsque toutes les molécules se concentrent en un seul point du contour. De plus, nous aimerions que ce vecteur soit indépendant de la taille de la cellule et qu'il dépende faiblement de la discrétisation des pixels adoptée.

Nous définissons donc le vecteur polarité normalisé comme :

$$\mathbf{p}_n = \frac{1}{(\sum_{i \in \mathcal{C}} I_i) \sqrt{\frac{1}{|\mathcal{C}|} \sum_{i \in \mathcal{C}} \|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_0\|^2}} \sum_{i \in \mathcal{C}} I_i (\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_0) \quad (\text{A.4})$$

Ainsi défini, le vecteur polarité normalisé est toujours invariant par changement d'origine des positions mais n'est plus invariant par changement d'origine des intensités. Cette dernière propriété est souhaitable pour que la polarité résulte de fortes fluctuations d'intensité sur le contour et soit robuste au bruit de détection.

En outre, on normalise par l'intensité totale et non l'intensité quadratique moyenne pour être robuste à la discrétisation des pixels. Cette normalisation permet en tout cas de rendre le vecteur invariant par multiplication par un facteur constant des intensités et des positions.

Le vecteur polarité ainsi défini n'est pas strictement compris entre 0 et 1. En effet, considérant un contour comprenant de nombreux pixels près de l'origine et quelques pixels très éloignés concentrant toute l'intensité, on peut aisément vérifier que le vecteur polarité normalisé calculé sur ce contour dépasse l'unité. En fait grâce à l'inégalité de Cauchy-Schwarz, on peut montrer que le vecteur \mathbf{p}_n est borné par $\sqrt{|\mathcal{C}|}$. Si par contre le contour est un cercle, \mathbf{p}_n est bien borné par un. En pratique, les contours des cellules sont plus proche du cercle que du contour précédemment défini et \mathbf{p}_n ne dépassera pas l'unité. Dans la suite, lorsque l'on se référera au vecteur polarité il s'agira donc du vecteur normalisé \mathbf{p}_n et il sera en pratique borné par l'unité.

Pour analyser les vecteurs de polarité, nous avons décidé de regarder d'une part la norme du vecteur, c'est à dire sa longueur indépendamment de son orientation :

$$\|\vec{p}\| = \sqrt{(p_x)^2 + (p_y)^2} \quad (\text{A.5})$$

où p_x et p_y sont respectivement l'abscisse et l'ordonnée du vecteur, et d'autre part son sens, autrement dit son orientation indépendamment de sa longueur.

Calcul de l'orientation des vecteurs

Pour analyser l'orientation de la polarisation, il nous suffit de regarder la direction et le sens du vecteur de polarité. Dans un premier temps, nous calculons l'angle α formé entre le vecteur et l'axe antéro-postérieur (Figure 43).

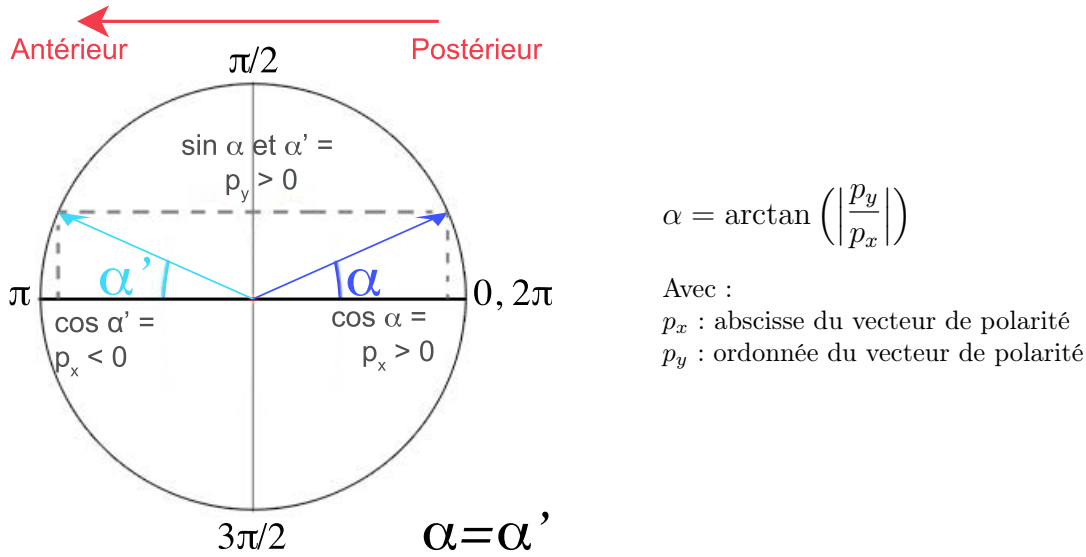


FIGURE 43 – Direction du vecteur de polarité.

Le cercle trigonométrique représente le repère dans lequel est calculé l'angle α , direction du vecteur par rapport à l'axe antéro-postérieur. Le calcul se fait à partir des coordonnées du vecteur de polarité, représentant le cosinus et le sinus de l'angle α . α est ensuite calculé avec l'arc tangente de ces valeurs.

Cette mesure nous donne l'angle entre la direction du vecteur et l'axe antéro-postérieur, mais ne nous informe pas sur le sens du vecteur. C'est à dire qu'un vecteur orienté vers le pôle antérieur donnera le même angle α qu'un angle orienté vers le pôle postérieur (Figure 43 où $\alpha = \alpha'$). Pour que l'angle α rende compte du sens du vecteur, il faut le modifier en fonction du signe des coordonnées p_x et p_y . Avec un repère de coordonnées classiques, tel qu'il est représenté dans la (Figure 43), un vecteur orienté vers le pôle postérieur aura un angle de 0, ou de 2π , et un vecteur orienté vers le pôle antérieur aura un angle π . Ce repère posera problème lorsque nous générerons la moyenne des orientations des vecteurs. En effet, la moyenne des angles d'un groupe de vecteurs orientés aléatoirement dans l'espace sera égale à π . De même, pour un groupe de vecteurs orientés vers le pôle antérieur, la moyenne sera également de π , tout comme celle des vecteurs orientés vers le pôle postérieur, dont les angles seront proches de 0 ou de 2π .

Nous avons alors décidé de changer le repère de coordonnées, de façon à ce qu'un

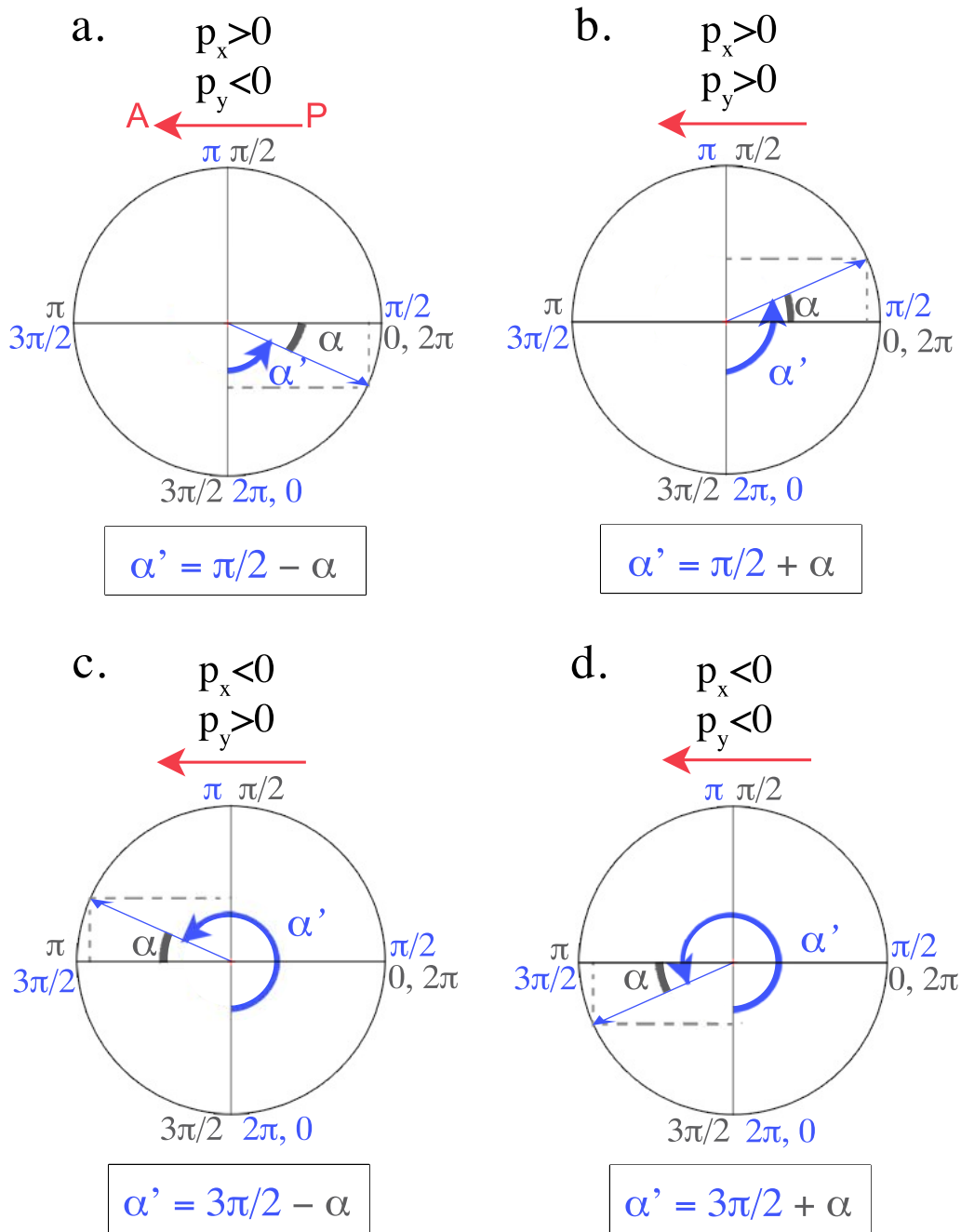


FIGURE 44 – Mesure de l'orientation de la polarisation par rapport à l'axe antéro-postérieur.

Selon les signes de p_x et de p_y , nous modifions l'angle α pour obtenir α' , soit l'orientation du vecteur de polarité dans le repère trigonométrique voulu (en bleu). Le repère trigonométrique original apparaît en gris.

a. Lorsque $p_x > 0$ et $p_y < 0$, il faut retrancher α à $\pi/2$.

b. Lorsque $p_x > 0$ et $p_y > 0$, il faut ajouter α à $\pi/2$.

c. Lorsque $p_x < 0$ et $p_y > 0$, il faut retrancher α à $3\pi/2$.

d. Lorsque $p_x < 0$ et $p_y < 0$, il faut ajouter α à $3\pi/2$.

Selon le repère choisi (en bleu) un vecteur orienté vers le pôle postérieur aura un angle $\alpha' = \pi/2$.

vecteur orienté vers le pôle postérieur ait un angle de $\pi/2$, et un vecteur orienté vers le pôle antérieur un angle de $3\pi/2$ (Figure 42 i). La moyenne des angles de vecteurs aléatoirement orienté sera toujours de π (Figure 44, repère de coordonnées en bleu). Les modifications apportées à α sont résumées dans la figure 44. En faisant ce choix, nous prenons le parti de nous intéresser uniquement à l'orientation des vecteurs le long de l'axe antéro-postérieur et de négliger les orientations le long de l'axe proximo-distal, du moins tant que nous regardons la moyenne des angles.

Représentation des données : calcul des moyennes des normes et des orientations.

Pour manipuler les données calculées plus haut, j'ai développé plusieurs scripts R, logiciel d'analyses statistiques et graphiques (Pour plus d'information : <http://www.r-project.org/>). Deux méthodes furent utilisées.

Analyse des données brutes : moyennes des données norme et orientation.

Afin d'évaluer la polarisation au cours du temps, nous regardons la moyenne de la norme des vecteurs de polarité (Equation A.5 et A.6, Figure 42 j-k). Cette fonction donne ce que nous appelons les données "brutes". A chaque point de temps, l'erreur sur la moyenne est calculée, et indiquée sur le graphe. La même méthode est appliquée dans l'analyse de l'orientation de la polarisation (Equation A.7).

$$p(t) = \frac{\sum_{i=1}^{n_t} ||\vec{p}_{it}||}{n_t} \quad (\text{A.6})$$

$$o(t) = \frac{\sum_{i=1}^{n_t} \alpha'_{it}}{n_t} \quad (\text{A.7})$$

Analyse de la norme et de l'orientation des vecteurs de polarisation au cours du temps.

Equation (A.6) : Norme de la polarisation au cours du temps.

$||\vec{p}_{it}||$: Norme du vecteur de polarisation de la cellule i au temps t, $p(t)$: Norme de polarisation selon le temps, t : temps en minutes avant la division, n_t : nombre de cellules au temps t.

Equation (A.7) : Orientation de la polarisation au cours du temps.

$o(t)$: Orientation de la polarisation selon le temps, t : temps en minutes avant la division, n_t : nombre de cellules au temps t, α'_{it} : orientation de la polarisation de la cellule i.

Analyse par Bootstrap des données dans différentes catégories temporelles.

Les données brutes montrent de nombreuses variations au cours du temps. Puisque nous

n'analysons que les changements globaux de polarisation, et sur les conseils de Francis Corson, notre collaborateur (LPS, ENS, rue d'Ulm), nous avons choisi de lisser ces courbes en regroupant les données en cinq catégories temporelles.

-25 min	Données de 0 à -50 minutes avant la division.
-75 min	Données de -51 à -100 minutes avant la division.
-125 min	Données de -101 à -150 minutes avant la division.
-175 min	Données de -151 à - 200 minutes avant la division.
-225 min	Données de -201 à - 250 minutes avant la division.

Chaque catégorie comprend n cellules, et pour chaque cellule est calculée la moyenne des normes de ses vecteurs de polarisation. Bien entendu, seuls les temps correspondants à la catégorie sont pris en compte dans le calcul de cette moyenne. A partir des n moyennes de polarisation, une estimation par Bootstrap (100 itérations) de la polarisation dans la catégorie est calculée. Tout comme pour les données brutes, l'erreur sur la moyenne est reportée sur les courbes.

Annexe B

Etude des intensités moyennes et de la forme des cellules

Calcul des intensités moyennes

Pour analyser l'intensité moyenne de fluorescence sur le contour cellulaire ainsi que dans la région apicale hors contour, nous avons réutilisé les *snakes* produits pour le calcul des vecteurs de polarités. Comme décrit dans l'annexe A, un contour de trois pixels de large est défini pour le calcul du vecteur de polarité. L'intensité moyenne de fluorescence au contour cellulaire est calculée à partir de ces mêmes pixels (Figure 45 b).

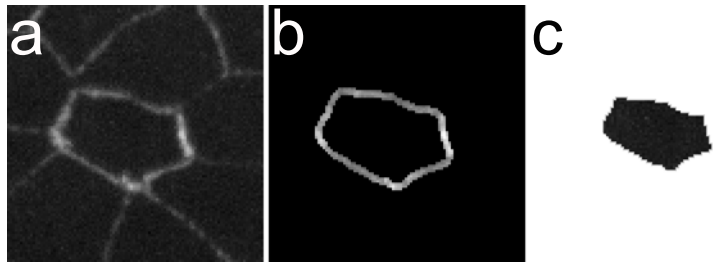


FIGURE 45 – Analyse des intensités moyennes

a. Cellule à analyser. **b.** L'intensité moyenne au contour de la cellule est calculé à partir d'une bande de trois pixels de large. **c.** L'intensité moyenne de la région apicale de la cellule est calculée à partir des pixels de la zone délimitée par le contour. Les trois pixels les plus proches du contour sont exclus de l'analyse.

L'intensité moyenne de fluorescence de la région apicale sera calculée à partir des pixels situés à l'intérieur de la zone définie par le contour. Pour que cette mesure ne soit pas affectée par l'intensité au contour, les trois pixels les plus proches du contour ont été retirés de la liste des pixels à analyser (Figure 45 c).

Analyse de la forme des cellules

Ici encore, nous avons réutilisé les *snakes* produits pour le calcul des vecteurs de polarités. Comme décrit dans l'annexe A, les *snakes* constituent les sommets des polygones définissant les contours. Ces *snakes* ont donc été converti en polygones sous FIJI, et l'aire du polygone (nombre de pixels) et sa solidité ont été calculés, toujours sous FIJI. La solidité mesure la convexité d'une forme, et correspond à :

$$S = \frac{A_s}{H} \quad (\text{B.1})$$

Avec A_s l'aire du polygone et H l'aire de l'enveloppe convexe du même polygone (Figure 46). Ainsi, une forme complètement convexe aura toujours une solidité égale à 1.

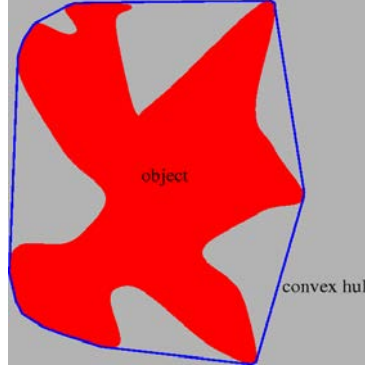


FIGURE 46 – Mesure de la solidité

L'*object* est la forme à analyser, et la *convex hull* est l'enveloppe convexe de l'*object*. Sur cette image, la solidité de l'enveloppe convexe est égale à 1 et la solidité de l'*object* est égale à 0,650.

Pour que le calcul de la solidité et de la surface apicale d'un cellule ne soit pas influencée par la division des cellules voisines, qui en s'arrondissant en modifie la forme, nous avons étudié ces paramètres entre -250 minutes, et -125 minutes, c'est à dire avant la première vague de division des cellules épidermales. Pour chaque cellule la moyenne de la surface apicale et de la solidité entre -250mn et -125mn a donc été calculée. Les boxplots représentent la distribution de ces moyennes, et les médianes des distributions des SOP et des cellules épidermales ont été comparées par un test de Mann-Whitney-Wilcoxon (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$). Ces analyses ont été faites à partir des *snakes* tracés sur les films GFP-Baz.

Annexe C

Analyse des données FRAP

Pour analyser le comportement des protéines Baz, Par-6, aPKC et E-Cad aux jonctions des SOPs et des cellules épidermales, nous avons étudié le recouvrement de leur fluorescence après photoblanchiment (FRAP pour Fluorescence Recovery After Photobleaching). Dans cette annexe, je décris les différentes étapes menant à l'analyse de ces données.

Acquisition des données : Pour chaque cellule la jonction antérieure ou postérieure est photoblanchie. Pour chaque génotype le recouvrement de fluorescence entre ces deux types de jonctions fut comparé, mais aucune différence n'a été observée. Nous regroupons donc les résultats obtenus pour les jonctions antérieures et postérieures. La région photoblanchie est un rectangle de $3\mu\text{m}$ de long sur $1\mu\text{m}$ de large. Une région contrôle comprenant tout le champ est aussi analysée (Figure 47). Enfin, nous avons mesuré le bruit de fond en mesurant l'auto-fluorescence d'une puppe sauvage dans les mêmes conditions d'acquisition. Une acquisition est faite toutes les 500ms. Pour mesurer l'intensité initiale de la jonction étudiée, 10 acquisitions pré-blanchiment sont effectuées. Post-blanchiment, le recouvrement d'intensité est mesuré pendant 150 secondes. L'intensité de fluorescence est mesurée sur une section de $2\mu\text{m}$.

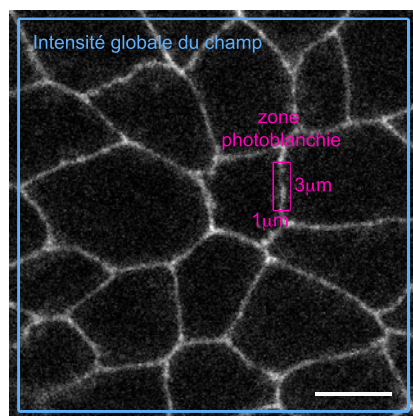


FIGURE 47 – Zones analysées pendant l'expérience de FRAP.

La zone photoblanchie apparaît en rose, c'est un rectangle de $3\mu\text{m}$ sur $1\mu\text{m}$. La zone bleue intègre tout le champ. L'étude de l'intensité de cette zone nous permet de mesurer le photoblanchiment au cours de l'acquisition

Normalisation des données, et ajustement de la courbe au modèle : Pour chaque jonction, les intensités sont normalisées avec le programme easyFRAP (pour plus d'informations, consulter le site <http://ccl.med.upatras.gr/index.php?id=easyfrap>). Tout d'abord, la valeur du bruit de fond est soustraite aux intensités mesurées dans la zone photoblanchie et dans la zone contrôle. Ensuite, les intensités sont normalisées suivant l'équation C.2. Les courbes obtenues avec les données normalisées sont ensuite ajustées à une équation à deux composantes, décrite par l'équation C.3. L'ajustement de courbe a été fait grâce au programme "GraphPad Prism", version 6 pour Mac (*GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com*). Cette équation à deux composantes partage le recouvrement en deux fractions, un recouvrement rapide et un recouvrement lent. Nous parlerons donc de composantes rapides et lentes.

Normalisation des données :

$$I(t)_{double} = \left(\frac{\frac{1}{n_{pre}} \sum_{t=1}^{n_{pre}} I(t)_c}{I(t)_c} \right) \left(\frac{I(t)}{\frac{1}{n_{pre}} \sum_{t=1}^{n_{pre}} I(t)} \right) \quad (C.1)$$

$$I(t)_{fullscale} = \frac{I(t)_{double} - I(t_{post-blanchiment})_{double}}{1 - I(t_{post-blanchiment})_{double}} \quad (C.2)$$

Normalisation des données d'intensité.

Equation (C.1) : Normalisation "*double*" : corrige les différences d'intensité de départ de la zone photoblanchie, ainsi que le photoblanchiment du à l'acquisition au long des 150s.

n_{pr} : nombre de points de temps pre-blanchiment, $I(t)_c$: Intensité contrôle : il s'agit de la moyenne de l'intensité mesurée sur tout le champ $I(t)$ Intensité de la zone étudiée avant et après blanchiment.

Equation (C.2) : Normalisation "*fullscale*" : fait en sorte que la courbe de recouvrement de fluorescence parte de zéro.

$I(t_{post-blanchiment})$: Intensité au premier temps après le photoblanchiment.

Ajustement de la courbe : équation à deux composantes :

$$I(t)_{ajust} = I(t_0) + SpanFast(1 - e^{-K_{fast}.t}) + SpanSlow(1 - e^{-K_{slow}.t}) \quad (C.3)$$

Avec :

$$SpanFast = 0.01(Plateau - I(t_0))PercentFast \quad (C.4)$$

$$SpanSlow = 0.01(Plateau - I(t_0))(100 - PercentFast) \quad (C.5)$$

Ajustement de la courbe.

Equations (C.3 à (C.5) : Ajustement de la courbe.

$I(i_0)$: Intensité normalisée au premier temps après le photoblanchiment. $I(i_0)$ est donc toujours égale à zéro. Kfast et Kslow : Constantes associées aux composantes rapide et lentes. Plateau : Valeur de l'intensité normalisée après recouvrement maximum. PercentFast et PercentSlow : Pourcentages de recouvrement associés respectivement aux composantes rapides et lentes.

Bibliographie

- [Aceto et al., 2006] Aceto, D., Beers, M., and Kemphues, K. J. (2006). Interaction of par-6 with cdc-42 is required for maintenance but not establishment of par asymmetry in *c. elegans*. *Dev Biol*, 299(2) :386–97.
- [Atwood et al., 2007] Atwood, S. X., Chabu, C., Penkert, R. R., Doe, C. Q., and Prehoda, K. E. (2007). Cdc42 acts downstream of bazooka to regulate neuroblast polarity through par-6 apkc. *J Cell Sci*, 120(Pt 18) :3200–6.
- [Atwood and Prehoda, 2009] Atwood, S. X. and Prehoda, K. E. (2009). apkc phosphorylates miranda to polarize fate determinants during neuroblast asymmetric cell division. *Curr Biol*, 19(9) :723–9.
- [Bachmann et al., 2008] Bachmann, A., Grawe, F., Johnson, K., and Knust, E. (2008). *Drosophila* lin-7 is a component of the crumbs complex in epithelia and photoreceptor cells and prevents light-induced retinal degeneration. *Eur J Cell Biol*, 87(3) :123–36.
- [Bachmann et al., 2001] Bachmann, A., Schneider, M., Theilenberg, E., Grawe, F., and Knust, E. (2001). *Drosophila* stardust is a partner of crumbs in the control of epithelial cell polarity. *Nature*, 414(6864) :638–643.
- [Beers and Kemphues, 2006] Beers, M. and Kemphues, K. (2006). Depletion of the co-chaperone cdc-37 reveals two modes of par-6 cortical association in *c. elegans* embryos. *Development*, 133(19) :3745–3754.
- [Bellaïche et al., 2004] Bellaïche, Y., Beaudoin-Massiani, O., Stüttem, I., and Schweisguth, F. (2004). The planar cell polarity protein strabismus promotes pins anterior localization during asymmetric division of sensory organ precursor cells in *drosophila*. *Development*, 131(2) :469–478.
- [Bellaïche et al., 2001] Bellaïche, Y., Ghosh, M., Kaltschmidt, J. A., Brand, A. H., and Schweisguth, F. (2001). Frizzled regulates localization of cell-fate determinants and mitotic spindle rotation during asymmetric cell division. *Nat Cell Biol*, 3(1) :50–57.
- [Bellaïche et al., 2001] Bellaïche, Y., Radovic, A., Woods, D. F., Hough, C. D., Parmantier, M. L., O’Kane, C. J., Bryant, P. J., and Schweisguth, F. (2001). The partner of inscuteable/discs-large complex is required to establish planar polarity during asymmetric cell division in *drosophila*. *Cell*, 106(3) :355–66.
- [Bellen et al., 2014] Bellen, H. J., Yamamoto, S., Couturier, L., and Schweisguth, F. (2014). *Methods in Molecular Biology*, volume 1187, pages 79–86. Springer New York.
- [Benton and Johnston, 2003a] Benton, R. and Johnston, D. S. (2003a). A conserved oligomerization domain in *drosophila* bazooka/par-3 is important for apical localization and epithelial polarity. *Current Biology*, 13(15) :1330–1334.

- [Benton and Johnston, 2003b] Benton, R. and Johnston, D. S. (2003b). Drosophila par-1 and 14-3-3 inhibit bazooka/par-3 to establish complementary cortical domains in polarized cells. *Cell*, 115(6) :691–704.
- [Benton et al., 2002] Benton, R., Palacios, I. M., and Johnston, D. S. (2002). Drosophila 14-3-3/par-5 is an essential mediator of par-1 function in axis formation. *Developmental Cell*, 3(5) :659–671.
- [Bergstrahl and St Johnston, 2012] Bergstrahl, D. T. and St Johnston, D. (2012). Epithelial cell polarity : what flies can teach us about cancer. *Essays Biochem*, 53 :129–40.
- [Betschinger et al., 2003] Betschinger, J., Mechtler, K., and Knoblich, J. A. (2003). The par complex directs asymmetric cell division by phosphorylating the cytoskeletal protein lgl. *Nature*, 422(6929) :326–330.
- [Bilder et al., 2003] Bilder, D., Schober, M., and Perrimon, N. (2003). Integrated activity of pdz protein complexes regulates epithelial polarity. *Nat Cell Biol*, 5(1) :53–8.
- [Blankenship et al., 2006] Blankenship, J. T., Backovic, S. T., Sanny, J. S. P., Weitz, O., and Zallen, J. A. (2006). Multicellular rosette formation links planar cell polarity to tissue morphogenesis. *Developmental Cell*, 11(4) :459–470.
- [Bray, 2006] Bray, S. J. (2006). Notch signalling : a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(9) :678–689.
- [Buffin and Gho, 2010] Buffin, E. and Gho, M. (2010). Laser microdissection of sensory organ precursor cells of *drosophila* microchaetes. *PLoS ONE*, 5(2) :e9285 EP –.
- [Bulgakova et al., 2013] Bulgakova, N. A., Grigoriev, I., Yap, A. S., Akhmanova, A., and Brown, N. H. (2013). Dynamic microtubules produce an asymmetric e-cadherin-bazooka complex to maintain segment boundaries. *J Cell Biol*, 201(6) :887–901.
- [Bulgakova and Knust, 2009] Bulgakova, N. A. and Knust, E. (2009). The crumbs complex : from epithelial-cell polarity to retinal degeneration. *Journal of Cell Science*, 122(15) :2587–2596.
- [Chabu and Doe, 2009] Chabu, C. and Doe, C. Q. (2009). Twins/pp2a regulates apkc to control neuroblast cell polarity and self-renewal. *Dev Biol*, 330(2) :399–405.
- [Chanet and Schweisguth, 2012] Chanet, S. and Schweisguth, F. (2012). Regulation of epithelial polarity by the e3 ubiquitin ligase neuralized and the bearded inhibitors in drosophila. *Nat Cell Biol*, 14(5) :467–476.
- [Chanet et al., 2009] Chanet, S., Vodovar, N., Mayau, V., and Schweisguth, F. (2009). Genome engineering-based analysis of bearded family genes reveals both functional redundancy and a nonessential function in lateral inhibition in drosophila. *Genetics*, 182(4) :1101–8.

- [Chartier et al., 2011] Chartier, N. T., Salazar Ospina, D. P., Benkemoun, L., Mayer, M., Grill, S. W., Maddox, A. S., and Labbé, J.-C. (2011). Par-4/lkb1 mobilizes nonmuscle myosin through anillin to regulate *c. elegans* embryonic polarization and cytokinesis. *Current Biology*, 21(4) :259–269.
- [Chen et al., 2008] Chen, W.-S., Antic, D., Matis, M., Logan, C. Y., Povelones, M., Anderson, G. A., Nusse, R., and Axelrod, J. D. (2008). Asymmetric homotypic interactions of the atypical cadherin flamingo mediate intercellular polarity signaling. *Cell*, 133(6) :1093–1105.
- [Courbard et al., 2009] Courbard, J.-R., Djiane, A., Wu, J., and Mlodzik, M. (2009). The apical/basal-polarity determinant scribble cooperates with the pcp core factor stbm/vang and functions as one of its effectors. *Developmental Biology*, 333(1) :67–77.
- [Couturier et al., 2013] Couturier, L., Mazouni, K., and Schweisguth, F. (2013). Numb localizes at endosomes and controls the endosomal sorting of notch after asymmetric division in drosophila. *Current Biology*, 23(7) :588–593.
- [Cowan and Hyman, 2007] Cowan, C. R. and Hyman, A. A. (2007). Acto-myosin reorganization and par polarity in *c. elegans*. *Development*, 134(6) :1035–43.
- [Cubas et al., 1991] Cubas, P., de Celis, J. F., Campuzano, S., and Modolell, J. (1991). Proneural clusters of achaete-scute expression and the generation of sensory organs in the drosophila imaginal wing disc. *Genes & Development*, 5(6) :996–1008.
- [Cuenca et al., 2003] Cuenca, A. A., Schetter, A., Aceto, D., Kempfues, K., and Seydoux, G. (2003). Polarization of the *c. elegans* zygote proceeds via distinct establishment and maintenance phases. *Development*, 130(7) :1255–1265.
- [David et al., 2005] David, N. B., Martin, C. A., Segalen, M., Rosenfeld, F., Schweisguth, F., and Bellaïche, Y. (2005). Drosophila ric-8 regulates galphai cortical localization to promote galphai-dependent planar orientation of the mitotic spindle during asymmetric cell division. *Nat Cell Biol*, 7(11) :1083–90.
- [de Vreede et al., 2014] de Vreede, G., Schoenfeld, J. D., Windler, S. L., Morrison, H., Lu, H., and Bilder, D. (2014). The scribble module regulates retromer-dependent endocytic trafficking during epithelial polarization. *Development*, 141(14) :2796–2802.
- [Devenport and Fuchs, 2008] Devenport, D. and Fuchs, E. (2008). Planar polarization in embryonic epidermis orchestrates global asymmetric morphogenesis of hair follicles. *Nat Cell Biol*, 10(11) :1257–1268.
- [Djiane et al., 2005] Djiane, A., Yogev, S., and Mlodzik, M. (2005). The apical determinants apkc and dpatj regulate frizzled-dependent planar cell polarity in the drosophila eye. *Cell*, 121(4) :621–631.

- [Fletcher et al., 2012] Fletcher, G. C., Lucas, E. P., Brain, R., Tournier, A., and Thompson, B. J. (2012). Positive feedback and mutual antagonism combine to polarize crumbs in the drosophila follicle cell epithelium. *Curr Biol*, 22(12) :1116–22.
- [Gallo et al., 2010] Gallo, C. M., Wang, J. T., Motegi, F., and Seydoux, G. (2010). Cytoplasmic partitioning of p granule components is not required to specify the germline in *c. elegans*. *Science*, 330(6011) :1685–9.
- [Georgiou et al., 2008] Georgiou, M., Marinari, E., Burden, J., and Baum, B. (2008). Cdc42, par6, and apkc regulate arp2/3-mediated endocytosis to control local adherens junction stability. *Curr Biol*, 18(21) :1631–8.
- [Gho et al., 1999] Gho, M., Bellaiche, Y., and Schweisguth, F. (1999). Revisiting the drosophila microchaete lineage : a novel intrinsically asymmetric cell division generates a glial cell. *Development*, 126(16) :3573–3584.
- [Gho and Schweisguth, 1998] Gho, M. and Schweisguth, F. (1998). Frizzled signalling controls orientation of asymmetric sense organ precursor cell divisions in drosophila. *Nature*, 393(6681) :178–181.
- [Goehring et al., 2011] Goehring, N. W., Trong, P. K., Bois, J. S., Chowdhury, D., Nicola, E. M., Hyman, A. A., and Grill, S. W. (2011). Polarization of par proteins by advective triggering of a pattern-forming system. *Science*, 334(6059) :1137–41.
- [Gomes et al., 2009] Gomes, J.-E., Corado, M., and Schweisguth, F. (2009). Van gogh and frizzled act redundantly in the drosophila sensory organ precursor cell to orient its asymmetric division. *PLoS One*, 4(2) :e4485.
- [Gönczy, 2008] Gönczy, P. (2008). Mechanisms of asymmetric cell division : flies and worms pave the way. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(5) :355–66.
- [Goulas et al., 2012] Goulas, S., Conder, R., and Knoblich, J. A. (2012). The par complex and integrins direct asymmetric cell division in adult intestinal stem cells. *Cell Stem Cell*, 11(4) :529–540.
- [Graybill et al., 2012] Graybill, C., Wee, B., Atwood, S. X., and Prehoda, K. E. (2012). Partitioning-defective protein 6 (par-6) activates atypical protein kinase c (apkc) by pseudosubstrate displacement. *J Biol Chem*, 287(25) :21003–11.
- [Grzeschik et al., 2010] Grzeschik, N. A., Parsons, L. M., Allott, M. L., Harvey, K. F., and Richardson, H. E. (2010). Lgl, apkc, and crumbs regulate the salvador/warts/hippo pathway through two distinct mechanisms. *Curr Biol*, 20(7) :573–81.
- [Hao et al., 2006] Hao, Y., Boyd, L., and Seydoux, G. (2006). Stabilization of cell polarity by the *c. elegans* ring protein par-2. *Dev Cell*, 10(2) :199–208.

- [Harris and Tepass, 2008] Harris, K. P. and Tepass, U. (2008). Cdc42 and par proteins stabilize dynamic adherens junctions in the drosophila neuroectoderm through regulation of apical endocytosis. *J Cell Biol*, 183(6) :1129–43.
- [Harris and Peifer, 2005] Harris, T. J. C. and Peifer, M. (2005). The positioning and segregation of apical cues during epithelial polarity establishment in drosophila. *J Cell Biol*, 170(5) :813–23.
- [Heitzler et al., 1996] Heitzler, P., Bourouis, M., Ruel, L., Carteret, C., and Simpson, P. (1996). Genes of the enhancer of split and achaete-scute complexes are required for a regulatory loop between notch and delta during lateral signalling in drosophila. *Development*, 122(1) :161–171.
- [Heitzler and Simpson, 1991] Heitzler, P. and Simpson, P. (1991). The choice of cell fate in the epidermis of drosophila. *Cell*, 64(6) :1083–1092.
- [Herranz et al., 2006] Herranz, H., Stamatakis, E., Feiguin, F., and Milán, M. (2006). Self-refinement of notch activity through the transmembrane protein crumbs : modulation of gamma-secretase activity. *EMBO Rep*, 7(3) :297–302.
- [Hoege et al., 2010] Hoege, C., Constantinescu, A.-T., Schwager, A., Goehring, N. W., Kumar, P., and Hyman, A. A. (2010). Lgl can partition the cortex of one-cell caenorhabditis elegans embryos into two domains. *Curr Biol*, 20(14) :1296–303.
- [Hong et al., 2001] Hong, Y., Stronach, B., Perrimon, N., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (2001). Drosophila stardust interacts with crumbs to control polarity of epithelia but not neuroblasts. *Nature*, 414(6864) :634–638.
- [Horvitz and Herskowitz, 1992] Horvitz, R. and Herskowitz, I. (1992). Mechanisms of asymmetric cell division : two bs or not two bs, that is the question. *Cell*, 68 :237–255.
- [Huotari and Helenius, 2011] Huotari, J. and Helenius, A. (2011). Endosome maturation. *EMBO J*, 30(17) :3481–500.
- [Januschke and Gonzalez, 2010] Januschke, J. and Gonzalez, C. (2010). The interphase microtubule aster is a determinant of asymmetric division orientation in drosophila neuroblasts. *The Journal of Cell Biology*, 188(5) :693–706.
- [Jiang and Edgar, 2012] Jiang, H. and Edgar, B. A. (2012). Intestinal stem cell function in drosophila and mice. *Current Opinion in Genetics & Development*, 22(4) :354–360.
- [Jinek et al., 2012] Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., and Charpentier, E. (2012). A programmable dual-rna-guided dna endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096) :816–821.
- [Joberty et al., 2000] Joberty, G., Petersen, C., Gao, L., and Macara, I. G. (2000). The cell-polarity protein par6 links par3 and atypical protein kinase c to cdc42. *Nat Cell Biol*, 2(8) :531–539.

- [Kemphues et al., 1988] Kemphues, K. J., Priess, J. R., Morton, D. G., and Cheng, N. S. (1988). Identification of genes required for cytoplasmic localization in early *c. elegans* embryos. *Cell*, 52(3) :311–20.
- [Kempkens et al., 2006] Kempkens, Ö., Médina, E., Fernandez-Ballester, G., Özüyaman, S., Le Bivic, A., Serrano, L., and Knust, E. (2006). Computer modelling in combination with in vitro studies reveals similar binding affinities of drosophila crumbs for the pdz domains of stardust and dmpar-6. *European Journal of Cell Biology*, 85(8) :753–767.
- [Knoblich, 2008] Knoblich, J. A. (2008). Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell*, 132(4) :583–97.
- [Kopan and Ilagan, 2009] Kopan, R. and Ilagan, M. X. G. (2009). The canonical notch signaling pathway : unfolding the activation mechanism. *Cell*, 137(2) :216–33.
- [Krahn et al., 2010a] Krahn, M. P., Bückers, J., Kastrup, L., and Wodarz, A. (2010a). Formation of a bazooka-stardust complex is essential for plasma membrane polarity in epithelia. *J Cell Biol*, 190(5) :751–60.
- [Krahn et al., 2009] Krahn, M. P., Egger-Adam, D., and Wodarz, A. (2009). Pp2a antagonizes phosphorylation of bazooka by par-1 to control apical-basal polarity in dividing embryonic neuroblasts. *Dev Cell*, 16(6) :901–8.
- [Krahn et al., 2010b] Krahn, M. P., Klopfenstein, D. R., Fischer, N., and Wodarz, A. (2010b). Membrane targeting of bazooka/par-3 is mediated by direct binding to phosphoinositide lipids. *Curr Biol*, 20(7) :636–42.
- [Lai, 2004] Lai, E. C. (2004). Notch signaling : control of cell communication and cell fate. *Development*, 131(5) :965–73.
- [Lai et al., 2001] Lai, E. C., Dablandre, G. A., Kintner, C., and Rubin, G. M. (2001). Drosophila neuralized is a ubiquitin ligase that promotes the internalization and degradation of delta. *Dev Cell*, 1(6) :783–94.
- [Langevin et al., 2005] Langevin, J., Le Borgne, R., Rosenfeld, F., Gho, M., Schweisguth, F., and Bellaïche, Y. (2005). Lethal giant larvae controls the localization of notch-signaling regulators numb, neuralized, and sanpodo in drosophila sensory-organ precursor cells. *Curr Biol*, 15(10) :955–62.
- [Le Borgne and Schweisguth, 2003] Le Borgne, R. and Schweisguth, F. (2003). Unequal segregation of neuralized biases notch activation during asymmetric cell division. *Dev Cell*, 5(1) :139–48.
- [Leibfried et al., 2008] Leibfried, A., Fricke, R., Morgan, M. J., Bogdan, S., and Bellaïche, Y. (2008). Drosophila cip4 and wasp define a branch of the cdc42-par6-apkc pathway regulating e-cadherin endocytosis. *Curr Biol*, 18(21) :1639–48.

- [Levayer et al., 2011] Levayer, R., Pelissier-Monier, A., and Lecuit, T. (2011). Spatial regulation of dia and myosin-ii by rhogef2 controls initiation of e-cadherin endocytosis during epithelial morphogenesis. *Nat Cell Biol*, 13(5) :529–540.
- [Ling et al., 2010] Ling, C., Zheng, Y., Yin, F., Yu, J., Huang, J., Hong, Y., Wu, S., and Pan, D. (2010). The apical transmembrane protein crumbs functions as a tumor suppressor that regulates hippo signaling by binding to expanded. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(23) :10532–7.
- [Lohia et al., 2012] Lohia, M., Qin, Y., and Macara, I. G. (2012). The scribble polarity protein stabilizes e-cadherin/p120-catenin binding and blocks retrieval of e-cadherin to the golgi. *PLoS One*, 7(11) :e51130.
- [Matakatsu and Blair, 2004] Matakatsu, H. and Blair, S. S. (2004). Interactions between fat and dachsous and the regulation of planar cell polarity in the drosophila wing. *Development*, 131(15) :3785–3794.
- [Mayer et al., 2005] Mayer, B., Emery, G., Berdnik, D., Wirtz-Peitz, F., and Knoblich, J. A. (2005). Quantitative analysis of protein dynamics during asymmetric cell division. *Curr Biol*, 15(20) :1847–54.
- [McClatchey, 2014] McClatchey, A. I. (2014). Erm proteins at a glance. *J Cell Sci*.
- [Médina et al., 2002] Médina, E., Williams, J., Klipfell, E., Zarnescu, D., Thomas, G., and Le Bivic, A. (2002). Crumbs interacts with moesin and beta(heavy)-spectrin in the apical membrane skeleton of drosophila. *J Cell Biol*, 158(5) :941–51.
- [Morais-de Sá et al., 2010] Morais-de Sá, E., Mirouse, V., and St Johnston, D. (2010). apkc phosphorylation of bazooka defines the apical/lateral border in drosophila epithelial cells. *Cell*, 141(3) :509–23.
- [Morton et al., 2002] Morton, D. G., Shakes, D. C., Nugent, S., Dichoso, D., Wang, W., Golden, A., and Kemphues, K. J. (2002). The caenorhabditis elegans par-5 gene encodes a 14-3-3 protein required for cellular asymmetry in the early embryo. *Dev Biol*, 241(1) :47–58.
- [Motegi and Seydoux, 2013] Motegi, F. and Seydoux, G. (2013). The par network : redundancy and robustness in a symmetry-breaking system. *Philosophical Transactions of the Royal Society B : Biological Sciences*, 368(1629).
- [Motegi and Sugimoto, 2006] Motegi, F. and Sugimoto, A. (2006). Sequential functioning of the ect-2 rhogef, rho-1 and cdc-42 establishes cell polarity in caenorhabditis elegans embryos. *Nat Cell Biol*, 8(9) :978–85.
- [Motegi et al., 2011] Motegi, F., Zonies, S., Hao, Y., Cuenca, A. A., Griffin, E., and Seydoux, G. (2011). Microtubules induce self-organization of polarized par domains in caenorhabditis elegans zygotes. *Nat Cell Biol*, 13(11) :1361–7.

- [Munro et al., 2004] Munro, E., Nance, J., and Priess, J. R. (2004). Cortical flows powered by asymmetrical contraction transport par proteins to establish and maintain anterior-posterior polarity in the early *c. elegans* embryo. *Dev Cell*, 7(3) :413–24.
- [Myster et al., 2003] Myster, S. H., Cavallo, R., Anderson, C. T., Fox, D. T., and Peifer, M. (2003). Drosophila p120catenin plays a supporting role in cell adhesion but is not an essential adherens junction component. *J Cell Biol*, 160(3) :433–49.
- [Nance and Zallen, 2011] Nance, J. and Zallen, J. A. (2011). Elaborating polarity : Par proteins and the cytoskeleton. *Development*, 138(5) :799–809.
- [Nanes et al., 2012] Nanes, B. A., Chiasson-MacKenzie, C., Lowery, A. M., Ishiyama, N., Faundez, V., Ikura, M., Vincent, P. A., and Kowalczyk, A. P. (2012). p120-catenin binding masks an endocytic signal conserved in classical cadherins. *J Cell Biol*, 199(2) :365–80.
- [Ogawa et al., 2009] Ogawa, H., Ohta, N., Moon, W., and Matsuzaki, F. (2009). Protein phosphatase 2a negatively regulates apkc signaling by modulating phosphorylation of par-6 in drosophila neuroblast asymmetric divisions. *J Cell Sci*, 122(Pt 18) :3242–9.
- [Ohata et al., 2011] Ohata, S., Aoki, R., Kinoshita, S., Yamaguchi, M., Tsuruoka-Kinoshita, S., Tanaka, H., Wada, H., Watabe, S., Tsuboi, T., Masai, I., and Okamoto, H. (2011). Dual roles of notch in regulation of apically restricted mitosis and apicobasal polarity of neuroepithelial cells. *Neuron*, 69(2) :215–230.
- [Ohshiro et al., 2000] Ohshiro, T., Yagami, T., Zhang, C., and Matsuzaki, F. (2000). Role of cortical tumour-suppressor proteins in asymmetric division of drosophila neuroblast. *Nature*, 408(6812) :593–596.
- [Pavlopoulos et al., 2001] Pavlopoulos, E., Pitsouli, C., Klueg, K. M., Muskavitch, M. A., Moschonas, N. K., and Delidakis, C. (2001). neuralized encodes a peripheral membrane protein involved in delta signaling and endocytosis. *Dev Cell*, 1(6) :807–16.
- [Pénalva and Mirouse, 2012] Pénalva, C. and Mirouse, V. (2012). Tissue-specific function of patj in regulating the crumbs complex and epithelial polarity. *Development*, 139(24) :4549–4554.
- [Peng et al., 2000] Peng, C.-Y., Manning, L., Albertson, R., and Doe, C. Q. (2000). The tumour-suppressor genes *lgl* and *dlg* regulate basal protein targeting in drosophila neuroblasts. *Nature*, 408(6812) :596–600.
- [Persani et al., 2007] Persani, L., Calebiro, D., and Bonomi, M. (2007). Technology insight : modern methods to monitor protein-protein interactions reveal functional tsh receptor oligomerization. *Nat Clin Pract End Met*, 3(2) :180–190.

- [Petronczki and Knoblich, 2001] Petronczki, M. and Knoblich, J. A. (2001). Dmpar-6 directs epithelial polarity and asymmetric cell division of neuroblasts in drosophila. *Nat Cell Biol*, 3(1) :43–49.
- [Pocha et al., 2011] Pocha, S. M., Wassmer, T., Niehage, C., Hoflack, B., and Knust, E. (2011). Retromer controls epithelial cell polarity by trafficking the apical determinant crumbs. *Curr Biol*, 21(13) :1111–7.
- [Prehoda, 2009] Prehoda, K. E. (2009). Polarization of drosophila neuroblasts during asymmetric division. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1(2) :a001388.
- [Rajan et al., 2009] Rajan, A., Tien, A.-C., Haueter, C. M., Schulze, K. L., and Bellen, H. J. (2009). The arp2/3 complex and wasp are required for apical trafficking of delta into microvilli during cell fate specification of sensory organ precursors. *Nat Cell Biol*, 11(7) :815–824.
- [Rhyu et al., 1994] Rhyu, M. S., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (1994). Asymmetric distribution of numb protein during division of the sensory organ precursor cell confers distinct fates to daughter cells. *Cell*, 76(3) :477–91.
- [Ribeiro et al., 2014] Ribeiro, P., Holder, M., Frith, D., Snijders, A. P., and Tapon, N. (2014). Crumbs promotes expanded recognition and degradation by the scf slimb /beta-trcp ubiquitin ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(19) :E1980–E1989.
- [Richardson and Pichaud, 2010] Richardson, E. C. N. and Pichaud, F. (2010). Crumbs is required to achieve proper organ size control during drosophila head development. *Development*, 137(4) :641–650.
- [Robinson et al., 2010] Robinson, B. S., Huang, J., Hong, Y., and Moberg, K. H. (2010). Crumbs regulates salvador/warts/hippo signaling in drosophila via the ferm-domain protein expanded. *Curr Biol*, 20(7) :582–90.
- [Roeth et al., 2009] Roeth, J. F., Sawyer, J. K., Wilner, D. A., and Peifer, M. (2009). Rab11 helps maintain apical crumbs and adherens junctions in the drosophila embryonic ectoderm. *PLoS ONE*, 4(10) :e7634 EP –.
- [Rolls et al., 2003] Rolls, M. M., Albertson, R., Shih, H.-P., Lee, C.-Y., and Doe, C. Q. (2003). Drosophila apkc regulates cell polarity and cell proliferation in neuroblasts and epithelia. *J Cell Biol*, 163(5) :1089–98.
- [Röper, 2012] Röper, K. (2012). Anisotropy of crumbs and apkc drives myosin cable assembly during tube formation. *Developmental Cell*, 23(5) :939–953.
- [Schaefer et al., 2001] Schaefer, M., Petronczki, M., Dorner, D., Forte, M., and Knoblich, J. A. (2001). Heterotrimeric g proteins direct two modes of asymmetric cell division in the drosophila nervous system. *Cell*, 107(2) :183–94.

- [Ségalen et al., 2010] Ségalen, M., Johnston, C. A., Martin, C. A., Dumortier, J. G., Prehoda, K. E., David, N. B., Doe, C. Q., and Bellaïche, Y. (2010). The fz-dsh planar cell polarity pathway induces oriented cell division via mud/numa in drosophila and zebrafish. *Dev Cell*, 19(5) :740–52.
- [Sen et al., 2012] Sen, A., Nagy-Zsvér-Vadas, Z., and Krahn, M. P. (2012). Drosophila patj supports adherens junction stability by modulating myosin light chain activity. *The Journal of Cell Biology*, 199(4) :685–698.
- [Siller and Doe, 2009] Siller, K. H. and Doe, C. Q. (2009). Spindle orientation during asymmetric cell division. *Nat Cell Biol*, 11(4) :365–374.
- [Simões et al., 2010] Simões, S. d. M., Blankenship, J. T., Weitz, O., Farrell, D. L., Tamada, M., Fernandez-Gonzalez, R., and Zallen, J. A. (2010). Rho-kinase directs bazooka/par-3 planar polarity during drosophila axis elongation. *Dev Cell*, 19(3) :377–88.
- [Simon, 2004] Simon, M. A. (2004). Planar cell polarity in the drosophila eye is directed by graded four-jointed and dachsous expression. *Development*, 131(24) :6175–6184.
- [Smith et al., 2007] Smith, C. A., Lau, K. M., Rahmani, Z., Dho, S. E., Brothers, G., She, Y. M., Berry, D. M., Bonneil, E., Thibault, P., Schweisguth, F., Le Borgne, R., and McGlade, C. J. (2007). apkc-mediated phosphorylation regulates asymmetric membrane localization of the cell fate determinant numb. *EMBO J*, 26(2) :468–80.
- [Song et al., 2013] Song, S., Eckerle, S., Onichtchouk, D., Marrs, J. A., Nitschke, R., and Driever, W. (2013). Pou5f1-dependent egf expression controls e-cadherin endocytosis, cell adhesion, and zebrafish epiboly movements. *Developmental Cell*, 24(5) :486–501.
- [Sotillos et al., 2004] Sotillos, S., Díaz-Meco, M. T., Caminero, E., Moscat, J., and Campuzano, S. (2004). Dapkc-dependent phosphorylation of crumbs is required for epithelial cell polarity in drosophila. *J Cell Biol*, 166(4) :549–57.
- [Sprinzak et al., 2010] Sprinzak, D., Lakhapal, A., Lebon, L., Santat, L. A., Fontes, M. E., Anderson, G. A., Garcia-Ojalvo, J., and Elowitz, M. B. (2010). Cis-interactions between notch and delta generate mutually exclusive signalling states. *Nature*, 465(7294) :86–90.
- [St Johnston and Ahringer, 2010] St Johnston, D. and Ahringer, J. (2010). Cell polarity in eggs and epithelia : parallels and diversity. *Cell*, 141(5) :757–74.
- [Suzuki and Ohno, 2006] Suzuki, A. and Ohno, S. (2006). The par-apkc system : lessons in polarity. *J Cell Sci*, 119(Pt 6) :979–87.
- [Tabuse et al., 1998] Tabuse, Y., Izumi, Y., Piano, F., Kemphues, K. J., Miwa, J., and Ohno, S. (1998). Atypical protein kinase c cooperates with par-3 to establish embryonic polarity in caenorhabditis elegans. *Development*, 125(18) :3607–3614.

- [Takeichi, 2014] Takeichi, M. (2014). Dynamic contacts : rearranging adherens junctions to drive epithelial remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(6) :397–410.
- [Tanentzapf and Tepass, 2003] Tanentzapf, G. and Tepass, U. (2003). Interactions between the crumbs, lethal giant larvae and bazooka pathways in epithelial polarization. *Nat Cell Biol*, 5(1) :46–52.
- [Tepass, 2012] Tepass, U. (2012). The apical polarity protein network in drosophila epithelial cells : regulation of polarity, junctions, morphogenesis, cell growth, and survival. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 28 :655–85.
- [Tepass and Knust, 1993] Tepass, U. and Knust, E. (1993). crumbs and stardust act in a genetic pathway that controls the organization of epithelia in drosophila melanogaster. *Developmental Biology*, 159(1) :311–326.
- [Tepass et al., 1990] Tepass, U., Theres, C., and Knust, E. (1990). crumbs encodes an egf-like protein expressed on apical membranes of drosophila epithelial cells and required for organization of epithelia. *Cell*, 61(5) :787 – 799.
- [Usui et al., 1999] Usui, T., Shima, Y., Shimada, Y., Hirano, S., Burgess, R. W., Schwarz, T. L., Takeichi, M., and Uemura, T. (1999). Flamingo, a seven-pass transmembrane cadherin, regulates planar cell polarity under the control of frizzled. *Cell*, 98(5) :585–595.
- [Vichas and Zallen, 2011] Vichas, A. and Zallen, J. A. (2011). Translating cell polarity into tissue elongation. *Semin Cell Dev Biol*, 22(8) :858–64.
- [Walther and Pichaud, 2010] Walther, R. F. and Pichaud, F. (2010). Crumbs/dapkc-dependent apical exclusion of bazooka promotes photoreceptor polarity remodeling. *Curr Biol*, 20(12) :1065–74.
- [Wang et al., 2009] Wang, C., Chang, K. C., Somers, G., Virshup, D., Ang, B. T., Tang, C., Yu, F., and Wang, H. (2009). Protein phosphatase 2a regulates self-renewal of drosophila neural stem cells. *Development*, 136(13) :2287–96.
- [Warrington et al., 2013] Warrington, S. J., Strutt, H., and Strutt, D. (2013). The frizzled-dependent planar polarity pathway locally promotes e-cadherin turnover via recruitment of rhogef2. *Development*, 140(5) :1045–54.
- [Wei et al., 2005] Wei, S.-Y., Escudero, L. M., Yu, F., Chang, L.-H., Chen, L.-Y., Ho, Y.-H., Lin, C.-M., Chou, C.-S., Chia, W., Modolell, J., and Hsu, J.-C. (2005). Echinoid is a component of adherens junctions that cooperates with de-cadherin to mediate cell adhesion. *Developmental Cell*, 8(4) :493–504.
- [Willard et al., 2004] Willard, F. S., Kimple, R. J., and Siderovski, D. P. (2004). Return of the gdi : the goloco motif in cell division. *Annu Rev Biochem*, 73 :925–51.

- [Wirtz-Peitz et al., 2008] Wirtz-Peitz, F., Nishimura, T., and Knoblich, J. A. (2008). Linking cell cycle to asymmetric division : Aurora-a phosphorylates the par complex to regulate numb localization. *Cell*, 135(1) :161–73.
- [Wodarz et al., 1993] Wodarz, A., Grawe, F., and Knust, E. (1993). Crumbs is involved in the control of apical protein targeting during drosophila epithelial development. *Mech Dev*, 44(2-3) :175–187.
- [Wodarz et al., 1995] Wodarz, A., Hinz, U., Engelbert, M., and Knust, E. (1995). Expression of crumbs confers apical character on plasma membrane domains of ectodermal epithelia of drosophila. *Cell*, 82(1) :67–76.
- [Wodarz et al., 1999] Wodarz, A., Ramrath, A., Kuchinke, U., and Knust, E. (1999). Bazooka provides an apical cue for inscuteable localization in drosophila neuroblasts. *Nature*, 402(6761) :544–547.
- [Wu et al., 2007] Wu, H., Feng, W., Chen, J., Chan, L.-N., Huang, S., and Zhang, M. (2007). Pdz domains of par-3 as potential phosphoinositide signaling integrators. *Mol Cell*, 28(5) :886–98.
- [Wu and Mlodzik, 2008] Wu, J. and Mlodzik, M. (2008). The frizzled extracellular domain is a ligand for van gogh/stbm during nonautonomous planar cell polarity signaling. *Developmental Cell*, 15(3) :462–469.
- [Wu and Mlodzik, 2009] Wu, J. and Mlodzik, M. (2009). A quest for the mechanism regulating global planar cell polarity of tissues. *Trends Cell Biol*, 19(7) :295–305.
- [Yamanaka et al., 2003] Yamanaka, T., Horikoshi, Y., Sugiyama, Y., Ishiyama, C., Suzuki, A., Hirose, T., Iwamatsu, A., Shinohara, A., and Ohno, S. (2003). Mammalian lgl forms a protein complex with par-6 and apkc independently of par-3 to regulate epithelial cell polarity. *Curr Biol*, 13(9) :734–43.
- [Yamanaka et al., 2001] Yamanaka, T., Horikoshi, Y., Suzuki, A., Sugiyama, Y., Kitamura, K., Maniwa, R., Nagai, Y., Yamashita, A., Hirose, T., Ishikawa, H., and Ohno, S. (2001). Par-6 regulates apkc activity in a novel way and mediates cell-cell contact-induced formation of the epithelial junctional complex. *Genes to Cells*, 6(8) :721–731.
- [Yeh et al., 2001] Yeh, E., Dermer, M., Commisso, C., Zhou, L., McGlade, C. J., and Boulianne, G. L. (2001). Neuralized functions as an e3 ubiquitin ligase during drosophila development. *Curr Biol*, 11(21) :1675–9.
- [Yoshihama et al., 2011] Yoshihama, Y., Sasaki, K., Horikoshi, Y., Suzuki, A., Ohtsuka, T., Hakuno, F., Takahashi, S.-I., Ohno, S., and Chida, K. (2011). Kibra suppresses apical exocytosis through inhibition of apkc kinase activity in epithelial cells. *Current Biology*, 21(8) :705–711.

- [Yu et al., 2010] Yu, J., Zheng, Y., Dong, J., Klusza, S., Deng, W.-M., and Pan, D. (2010). Kibra functions as a tumor suppressor protein that regulates hippo signaling in conjunction with merlin and expanded. *Dev Cell*, 18(2) :288–99.
- [Zallen and Wieschaus, 2004] Zallen, J. A. and Wieschaus, E. (2004). Patterned gene expression directs bipolar planar polarity in drosophila. *Dev Cell*, 6(3) :343–55.
- [Zhou et al., 2011] Zhou, B., Wu, Y., and Lin, X. (2011). Retromer regulates apical-basal polarity through recycling crumbs. *Dev Biol*, 360(1) :87–95.
- [Zhou and Hong, 2012] Zhou, W. and Hong, Y. (2012). Drosophila patj plays a supporting role in apical-basal polarity but is essential for viability. *Development*, 139(16) :2891–2896.
- [Zou et al., 2012] Zou, J., Wang, X., and Wei, X. (2012). Crb apical polarity proteins maintain zebrafish retinal cone mosaics via intercellular binding of their extracellular domains. *Developmental Cell*, 22(6) :1261–1274.

Division asymétrique et remodelage de la polarité épithéliale : Dynamique de la polarisation des cellules précurseurs des organes sensoriels externes chez *Drosophila melanogaster*.

Résumé

Les divisions asymétriques permettent l'apparition de deux cellules filles différentes via la ségrégation polarisée de déterminants cellulaires pendant la division. La polarisation de la cellule mère est essentielle au bon déroulement des divisions asymétriques. Les précurseurs des organes sensoriels externes de la Drosophile (SOP) se divisent asymétriquement dans le plan de l'épithélium du thorax. La polarisation planaire des SOP dépend de la localisation asymétrique du complexe PAR (Baz-Par6-aPKC). Néanmoins, ces protéines sont aussi impliquées dans le maintien de la polarité apico-basale de l'épithélium. Les mécanismes régulant le remodelage de la polarité épithéliale, permettant la polarisation planaire du complexe PAR sont inconnus.

Au cours de ma Thèse, j'ai développé une méthode d'analyse quantitative de la polarisation des protéines PAR au cours du temps. Je montre que Baz, Par6 et aPKC se sont asymétriques avant la mitose, et que cette polarisation dépend de la PCP (Planar Cell Polarity). J'ai également identifié Expanded (ex) et p120/catenin (p120ctn), dont l'expression est réduite dans les SOP, respectivement comme régulateurs de Crumbs et de la dynamique des jonctions. Leur inhibition promeut le remodelage de la polarité épithéliale et la polarisation des SOP.

Un modèle de polarisation de la SOP est proposé, où l'inhibition spécifique d'ex et de p120ctn libère Par6-aPKC et Baz, permettant la formation du complexe PAR. Ce dernier interprète la PCP et devient asymétrique. Ainsi, ce travail relie la spécification de la SOP et sa division asymétrique, et propose un modèle général pour l'étude des divisions asymétriques dans les épithéliums.

Mots clés

Polarité, Division asymétrique, protéines PAR, Imagerie sur tissu vivant, Drosophile, Epithélium.

**Asymmetric cell division and epithelial polarity remodeling :
Drosophila melanogaster external sensory organ precursor cell polarisation
dynamic.**

Abstract

During development, cell fate diversity can be generated by asymmetric cell division. As fate asymmetry can result from the unequal segregation at mitosis of cell fate determinants, polarization of the mother cell is essential for this process. The epithelial Sensory Organ Precursor cells (SOPs) divide asymmetrically within the plane of the notum epithelium in *Drosophila*. Planar polarization of mitotic SOPs critically depends on the asymmetric distribution of the PAR polarity complex. Nevertheless, PAR proteins are also involved in the maintenance of epithelial apico-basal polarity. When and how this epithelial polarity is remodelled to allow planar polarization of the PAR complex is unknown.

During my thesis, I developed a quantitative live-imaging approach to monitor polarization of the PAR proteins. I showed that the three members of the PAR complex (Bazooka (Baz), Par6 and atypical Protein Kinase C (aPKC)) become planar polarized prior to mitosis and identified Planar Cell Polarity (PCP) as the initial symmetry breaking input. Expanded (Ex) and p120/catenin (p120ctn) were identified as SOP-specific regulators of Crumbs and AJ dynamics, respectively, that negatively regulate planar polarization in SOPs.

This work led to a model whereby decreasing levels of Ex and p120ctn in SOPs increases free Par6-aPKC and Baz to promote the formation and polarization of the Baz-Par6-aPKC complex. Thus, this study links fate determination to asymmetric cell division and provides a general framework to understand how epithelial cells can divide asymmetrically despite having junctions.

Keywords

Polarity, Asymmetric cell division, PAR proteins, Live imaging, *Drosophila*, Epithelium.

Division asymétrique et remodelage de la polarité épithéliale : dynamique de la polarisation des cellules précurseurs des organes sensoriels externes chez *Drosophila melanogaster*.

Charlotte Besson

Les divisions asymétriques permettent l'apparition de deux cellules filles différentes via la ségrégation polarisée de déterminants cellulaires pendant la division. La polarisation de la cellule mère est essentielle au bon déroulement des divisions asymétriques. Les précurseurs des organes sensoriels externes de la Drosophile (SOP) se divisent asymétriquement dans le plan de l'épithélium du thorax. La polarisation planaire des SOP dépend de la localisation asymétrique du complexe PAR (Baz-Par6-aPKC). Néanmoins, ces protéines sont aussi impliquées dans le maintien de la polarité apico-basale de l'épithélium. Les mécanismes régulant le remodelage de la polarité épithéliale, permettant la polarisation planaire du complexe PAR sont inconnus.

Au cours de ma Thèse, j'ai développé une méthode d'analyse quantitative de la polarisation des protéines PAR au cours du temps. Je montre que Baz, Par6 et aPKC se sont asymétriques avant la mitose, et que cette polarisation dépend de la PCP (Planar Cell Polarity). J'ai également identifié Expanded (ex) et p120/catenin (p120ctn), dont l'expression est réduite dans les SOP, respectivement comme régulateurs de Crumbs et de la dynamique des jonctions. Leur inhibition promeut le remodelage de la polarité épithéliale et la polarisation des SOP.

Un modèle de polarisation de la SOP est proposé, où l'inhibition spécifique d'ex et de p120ctn libère Par6-aPKC et Baz, permettant la formation du complexe PAR. Ce dernier interprète la PCP et devient asymétrique. Ainsi, ce travail relie la spécification de la SOP et sa division asymétrique, et propose un modèle général pour l'étude des divisions asymétriques dans les épithéliums.

Mots clés : Polarité, Division asymétrique, protéines PAR, Imagerie sur tissu vivant, Drosophile, Epithélium.

